

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**Aportaciones moleculares al diagnóstico de las
multiparasitaciones por geohelminfos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Elena Dacal Picazo

DIRECTORES

Esperanza Rodríguez de las Parras
José María Saugar Cruz

Madrid

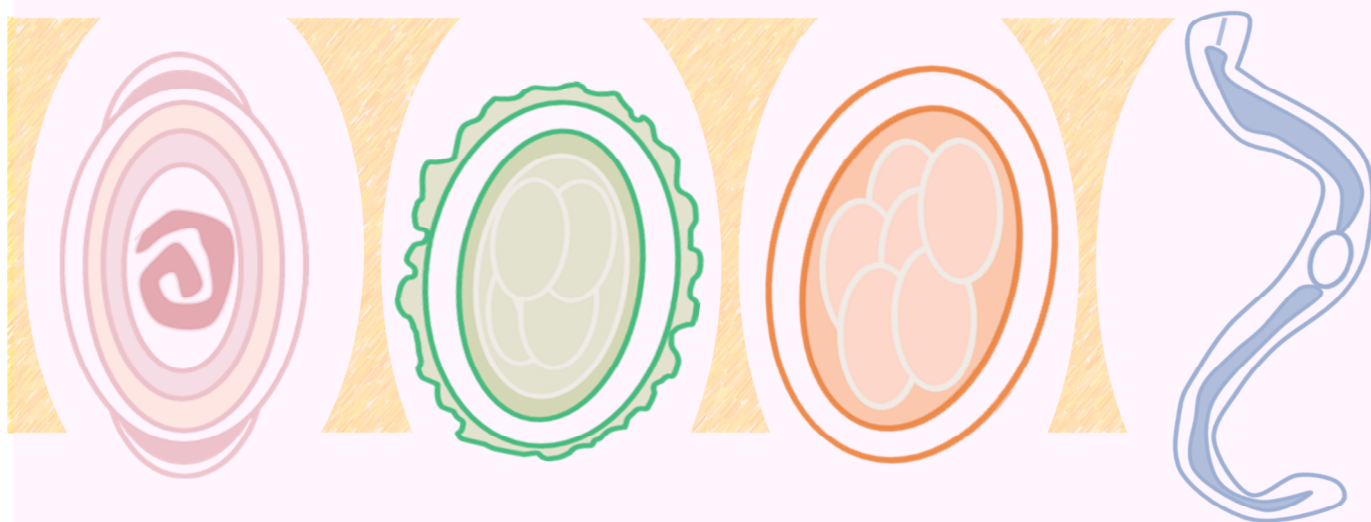


UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, FISIOLÓGÍA Y MICROBIOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

Aportaciones moleculares al diagnóstico de las multiparasitaciones por geohelmintos.



Memoria para optar al grado a Doctor presentada por:

Elena Dacal Picazo

DIRECTORES:

Dra. Esperanza Rodríguez de las Parras
Dr. José María Saugar Cruz

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, FISIOLÓGÍA Y MICROBIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

Aportaciones moleculares al diagnóstico de las
multiparasitaciones por geohelminths.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR:

Elena Dacal Picazo

Madrid, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA, FISIOLÓGÍA Y MICROBIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

Aportaciones moleculares al diagnóstico de las
multiparasitaciones por geohelminetos.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR:

Elena Dacal Picazo

Directores:

Dra. Esperanza Rodríguez de las Parras

Dr. José María Saugar Cruz

Tutor académico:

Dr. Francisco Bolás Fernández

*Had I the heavens' embroidered cloths,
Enwrought with golden and silver light,
The blue and the dim and the dark cloths
Of night and light and the half light,
I would spread the cloths under your feet:
But I, being poor, have only my dreams;
I have spread my dreams under your feet;
Tread softly because you tread on my dreams.*

W. Yeats

Ha llegado el momento del reconocimiento, de desvestirnos de las capas de títulos que hemos ido recopilando a lo largo de estos años, dejarlos apartados en una silla y reconocer abierta y públicamente, que este trabajo no es sólo mío, que no puedo apropiarme su completa autoría, que mi nombre está formado por numerosos nombres.

En primer lugar, quiero agradecerse a mis “padres biológicos” y a la vez directores de esta tesis doctoral, Esperanza Rodríguez de las Parras y José María Saugar Cruz. Gracias por haberme dado un hogar con forma de laboratorio, por alimentar mis inquietudes, y vestirme con bata y guantes.

Esperanza, gracias, eres para mí un ejemplo de humildad y de esfuerzo. Tu nombre se corresponde con el buen trabajo. Gracias por enseñarme que la clave está en la constancia, y demostrarme a cada minuto tu compromiso continuo. Por cuidarme. Gracias por creer en mí y luchar hasta el final, por darme todas las oportunidades. Gracias, te admiro.

José, eres un ejemplo de filosofía, y eso es lo que es un doctorado. No tendría manera de expresar con palabras ni con gestos la parte de ti que está en mí después de este trabajo. Gracias. Por tu motivación e inspiración. Por estar en todos y cada uno de los momentos, por ayudarme siempre con todo, siempre con una sonrisa.

Vuestra mezcla es la sintonía perfecta y ha sido un placer poder escucharla. Gracias.

A Francisco Bolás, porque su tutorización ha sido impecable, gracias por toda tu ayuda e interés a lo largo de este camino.

Al hogar, el laboratorio de Parasitología del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III, en especial a la Unidad de Diagnóstico Serológico de Parasitosis.

A Sonsoles, compañera de fatigas durante estos años. Gracias por tu paciencia, tu ayuda, tu disposición y tu compromiso. A Marga, por ayudarme en los inicios y contagiarnos a todos de tu alegría, a María José por estar en el durante y aportar siempre el toque de originalidad y a Aída por continuar en el presente, aconsejarme y ayudarme en todo momento. Gracias por todo vuestro apoyo, ayuda, consejos, ánimo y comprensión. Este trabajo está hecho de vuestras manos, corazón e intelecto.

A Olga, Tamara, Eva, Teresa... y al resto de estudiantes que se han asomado por el laboratorio y han aportado un soplo de viento.

Al resto de compañeros del laboratorio, en especial a Bego, Silvia, Sheila, Elena, Marta, Sandra y Ramón. Gracias por todos los días, por vuestra ayuda y preocupación, por haber formado una bonita familia y haberme dejado ser parte de ella.

A Carmen Chicharro, Javier Nieto, Isabel Fuentes y Emi, por todos los buenos momentos y vuestra ayuda para todo. A Carmen Cañavate y Almudena, gracias también por vuestra preocupación y ánimos.

A Chus, Ana, Teresa, Belén y Felisa, por toda vuestra ayuda y consejos durante estos años. A Javier, aunque reciente incorporación, gracias por todas las conversaciones y apoyo.

A María Flores, José Miguel, Alicia, Aly, Ana, Eugenia, Javier Moreno y en especial a Laura porque tu ayuda ha hecho que este camino fuera más fácil. Gracias por todos los momentos, por vuestro interés y apoyo.

A David Carmena por ser fuente de motivación, por escucharme y aconsejarme. Ha sido muy estimulante tenerte de compañero. Gracias por toda tu ayuda y por ser para mí un ejemplo.

A Israel Cruz, gracias por tu interés y consejos todos estos años y por haber contado conmigo. Me siento muy afortunada de poder contar contigo y aprender de ti, has sido y eres fuente de inspiración. Gracias por motivarme y convertir los retos en oportunidades.

A mis profesores de la universidad en especial a Benito Muñoz y a Eduardo Malmierca, por contagiarme con su pasión y despertarme grandes inquietudes.

Un especial agradecimiento a Pedro Fernández Soto y a Antonio Muro, a Fernando Salvador, así como a Francisco Merino por sus intensas colaboraciones, apoyo y consejos en todos los proyectos.

A los mozambicanos, etíopes y angolanos, en especial a Jacob por enseñarnos que el camino está ahí delante. A Arancha y a Melaku por acogerme en su casa, a Augusto por ayudarme en todo y a las hermanas Teresianas porque “tudo passa”. Gracias a esta escuadra geográfica por darme vida, “en África cuando muere un anciano desaparece una biblioteca”.

A Marta, por ser cómplice de todas las andaduras y en especial ésta desde el primer paso, porque las cosas más inverosímiles las hemos pasado juntas, y a Almudena, por tener siempre una palabra de ánimo y un plan de rescate. A María, Ángeles, Irene y Noelia, por todos estos años y los que vendrán. A Laura, Inés, Aída, Arturo, Rodri, Kike y Juan, porque los inicios no han sido fáciles y habéis estado hasta el final. A Santi por ofrecerme un espacio donde convivir con mis ideas. A David por toda tu paciencia. A Héctor por su estimulante interés, a Chechu por su motivación contagiosa y a Luis por tu escucha sincera. A Olga porque este camino ha sido mucho más fácil y divertido juntas. A Rafa, por toda tu ayuda y consejos, gracias por hacer que siempre entre un rayito de sol por la ventana. Gracias a todos por vuestra comprensión, paciencia y sobre todo cariño.

A mi familia, en especial a mis hermanos y a mis padres. A Javi, ejemplo de practicidad y a Pepe, de fidelidad. A los dos, gracias por todo vuestro apoyo y ayuda para que esto saliera adelante, por ser referente y abrirme no sólo un camino, sino enseñarme que existen numerosos. Por último, el agradecimiento más especial se lo dedico a mis padres, por educarme en términos de justicia, por su comprensión, disposición y apoyo en todo momento. Gracias por todo el esfuerzo. A mi madre, que lo ha dado todo por todos, que nos ha dado su vida. A mi padre, por aportar siempre las pinceladas exactas de humor e imaginación. Gracias a los dos por creer tanto como yo en esto.

Gracias al teatro, a la música, y a los libros que han hecho de este viaje una bonita experiencia.

Gracias porque este trabajo es tan vuestro como mío.

Os (re)quiero.

A decorative graphic on the left side of the page. It features a large, light yellow triangle pointing to the right. Inside this triangle, there is a circular area containing a complex geometric pattern of concentric squares and diamonds in shades of brown and gold. The background of the entire page is a solid light yellow color.

Índice

Índice

Abreviaturas	1
Resumen.....	3
Summary	4
1. Introducción	7
1.1. Generalidades de las infecciones por geohelminetos.	7
1.1.1. <i>Ascaris lumbricoides</i> y ascariasis.	9
1.1.2. <i>Trichuris</i> spp. y tricuriasis.	12
1.2.3. <i>Ancylostoma duodenale</i> / <i>Necator americanus</i> y uncinuriasis.....	14
1.2.4. <i>Strongyloides</i> spp. y estrongiloidiasis.....	18
1.2. Epidemiología de las geohelminuriasis.	21
1.2.1. Las geohelminuriasis en países endémicos.	21
1.2.2. Las geohelminuriasis importadas.	30
1.3. Diagnóstico de las geohelminuriasis.	32
1.3.1. Diagnóstico clínico.....	32
1.3.2. Diagnóstico parasitológico.	33
1.3.3. Diagnóstico inmunológico.	36
1.3.4. Diagnóstico molecular.....	42
1.4. Control de las geohelminuriasis.	47
2. Objetivos	51
3. Material y métodos.	53
3.1. Material biológico.	53
3.1.1. Muestras de parásitos.....	53
3.1.2. Muestras biológicas humanas.....	53
3.1.3. Aspectos éticos.....	56
3.2. Áreas geográficas estudiadas.....	56
3.2.1. España.	56
3.2.2. Angola.....	56
3.2.3. Etiopía.....	57
3.2.4. Mozambique.	58
3.3. Métodos.	59
3.3.1. Técnicas parasitológicas convencionales.	59
3.3.2. Método ELISA comercial para la detección de anticuerpos IgG frente a <i>Strongyloides</i> spp.	60
3.3.3. Método ELISA “in house” para la detección de anticuerpos IgG1 e IgG4 frente a <i>Strongyloides</i> spp.	60
3.3.4. Método <i>Western Blot</i>	62

3.3.5. Concentración de las muestras de heces.....	64
3.3.6. Dopaje de muestras de heces	64
3.3.7. Extracción de ADN.....	64
4. Resultados	75
4.1. Diagnóstico serológico de estrongiloidiasis	75
4.1.1. Método ELISA “in house” para la detección de anticuerpos IgG1 e IgG4 frente a <i>Strongyloides</i> spp.....	75
4.1.2. Evaluación de la técnica ELISA en muestras clínicas de sueros de pacientes inmigrantes o viajeros con sospecha de padecer estrongiloidiasis.....	79
4.1.3. Aplicación de la técnica de ELISA-IgG1/IgG4 en muestras de suero de población general en zona endémica (Etiopía).	107
4.1.4. Diagnóstico de la estrongiloidiasis mediante el método de <i>Western Blot</i> (WB).	107
4.2. Diagnóstico molecular de geohelmintiasis.	111
4.2.1. Extracción de ADN a partir de muestras de heces: comparación de protocolos de extracción.	111
4.2.2. Protocolos de amplificación por PCR en tiempo real (PCR-rt) en formato simple para <i>Ascaris</i> spp., <i>Trichuris</i> spp., <i>Necator</i> spp., <i>Ancylostoma</i> spp. y <i>Strongyloides</i> spp.	113
4.2.3. Protocolo de amplificación por PCR en tiempo real en formato múltiplex.....	115
4.2.4. Evaluación de la técnica PCR-rt-múltiplex en muestras clínicas de heces de pacientes inmigrantes o viajeros, con sospecha de padecer geohelmintiasis.	116
4.2.5 Aplicación de la técnica PCR-rt-múltiplex en muestras de heces de población escolar en zona endémica: Angola.....	123
4.2.6. Aplicación de la técnica PCR-rt-múltiplex en muestras de heces de población general en zona endémica: Mozambique.....	128
5. Discusión	131
5.1. Diagnóstico serológico de la estrongiloidiasis.....	131
5.2. Diagnóstico molecular de las geohelmintiasis	143
6. Conclusiones.....	155
7. Bibliografía	159
Anexo 1. Cuestionario prevalencia estrongiloidiasis.....	159
Anexo 2. Cuestionario de estudio de geohelminthos y <i>Strongyloides stercoralis</i>	160

The background is a light cream color. A large, semi-transparent yellow diamond shape is positioned on the right side. On the left, there is a circular graphic element with a complex geometric pattern of concentric squares and lines in shades of brown and gold. The word "Abreviaturas" is written in a bold, dark brown font, centered within the yellow diamond.

Abreviaturas

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AESI: Acción Estratégica en Salud Intramural

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

BCA: Ácido bicinconínico

BSA: Seroalbúmina bovina

CISM: Centro de Investigaçao em Saúde de Manhica

CRESIB: Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona

C.O.: *Cut-off*/Punto de corte

DALYs: *Disability Adjusted Life Years*/Años de vida ajustados por discapacidad

DO: Densidad óptica

E/S: Antígenos de Excreción/Secreción

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*/Análisis de Enzima inmunoensayo

FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer*/Resonancia de fluorescencia por transferencia de energía

GPAT: *Gelatin Particle indirect Agglutination tests*/Test de alutinação indirecta con partículas de gelatina

HTLV-1: Virus linfotrópico humano de células T tipo 1

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IgG: Inmunoglobulinas G

IgG-T: Inmunoglobulinas G totales

IgG1: Inmunoglobulinas G isotipo 1

IgG-2: Inmunoglobulinas G isotipo 2

IgG-3: Inmunoglobulinas G isotipo 3

IgG4: Inmunoglobulinas G isotipo 4

IHAT: *Indirect Hemagglutination Antibody Test*/Test de anticuerpos de hemaglutinación indirecta

ITS1: Espaciador transcrito interno 1

ITS2: Espaciador transcrito interno 2

kDa: Kilodalton

L1: Larva de primer estadio

L2: Larva de segundo estadio.

L3: Larva de tercer estadio

L4: Larva de cuarto estadio.

LAMP: *Loop-mediated isothermal amplification/Amplificación isotérmica mediada por bucle*

LIPS: Luciferase Immunoprecipitation Systems/Sistema de Inmunoprecipitación por Luciferasa

NCBI: *National Center for Biotechnology Information/Centro Nacional de Información en Biotecnología*

NTDs: *Neglected Tropical Diseases/Enfermedades tropicales desatendidas*

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONU: Organización de las Naciones Unidas

PAHO: *Pan American Health Organization/Organización PanAmericana de Salud*

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RFEF: Real Federación Española de Fútbol

RU: Ratio de Unión

SDS: Dodecil sulfato sódico

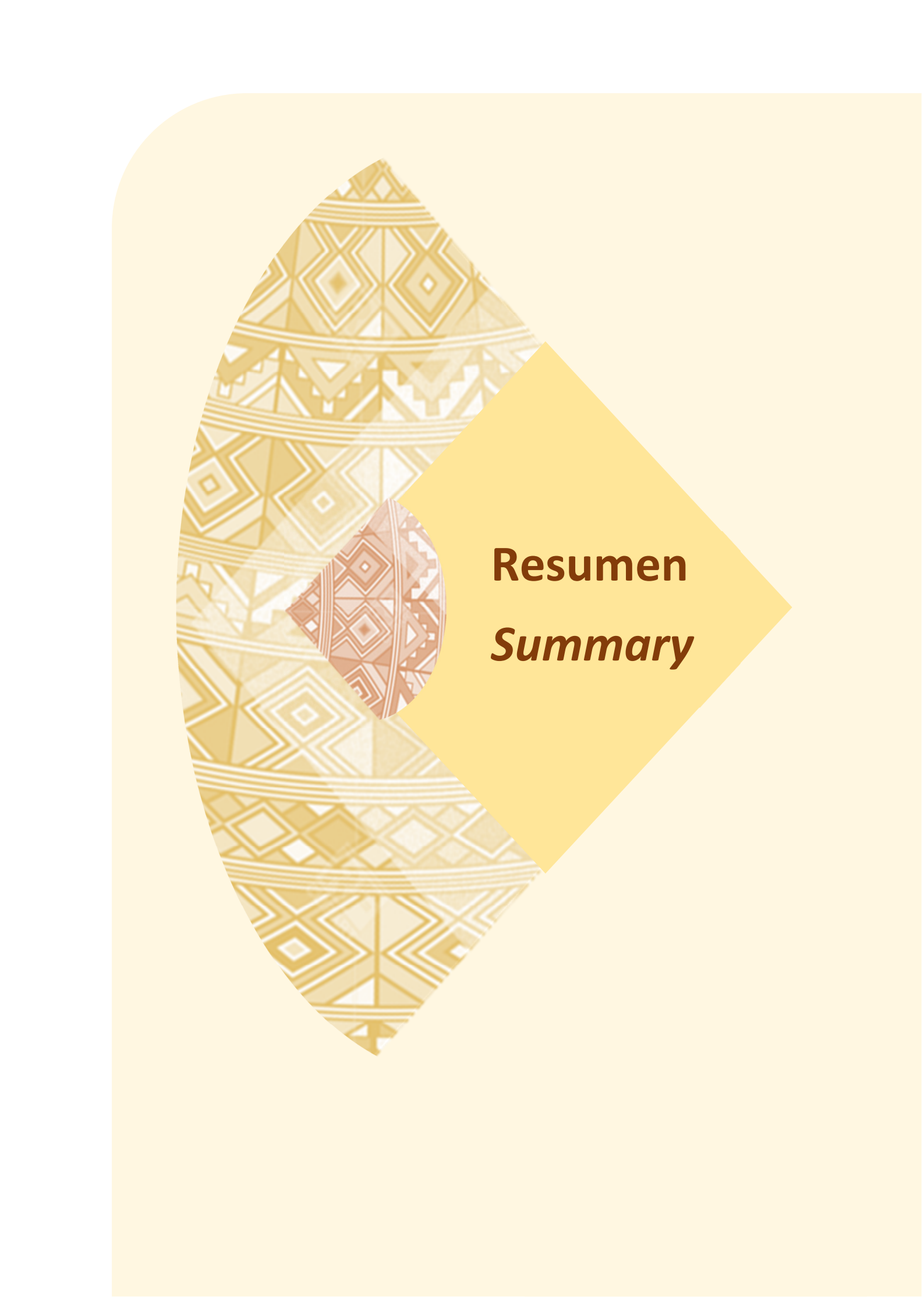
SEMTSI: Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional

STHs: *Soil transmitted Helminths/Helminthos transmitidos por el suelo –geohelminthos–*

SNS: Sistema Nacional de Salud

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

WB: *Western Blot/Transferencia de proteínas*



Resumen *Summary*

Resumen

El diagnóstico de las geohelmintiasis por *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y *Strongyloides stercoralis* es actualmente uno de los grandes retos diagnósticos en parasitología, siendo además definidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como las enfermedades más prevalentes dentro de las *Neglected Tropical Diseases* (NTDs). Actualmente el diagnóstico basado en técnicas parasitológicas convencionales para las uncinariasis, ascariasis y tricuriasis hacen necesario la puesta a punto de técnicas diagnósticas más sensibles y específicas para su correcta detección y para una mejor evaluación de los programas de control con administración masiva de fármacos establecidos por la OMS. En el caso de la estrongiloidiasis, debido a la forma de la presentación de la enfermedad (crónica con un elevado porcentaje de asintomáticos), a la carencia de una técnica de referencia “gold standard” y a la frecuencia de su aparición en nuestro país como una de las primeras causas de eosinofilia no filiada en población inmigrante y viajeros a zona endémica, este reto es aún mayor.

Los objetivos en los cuales se encuentra enmarcada esta tesis doctoral responden, de una forma seria, novedosa y actual, al problema del diagnóstico de estas patologías con que se encuentra el personal sanitario del Sistema Nacional de Salud y los investigadores cuya línea de trabajo está dirigida al estudio de estas parasitosis.

La amplia batería de técnicas diagnósticas empleadas, así como las herramientas utilizadas para llegar a ellas con una alta especificidad y sensibilidad son totalmente acordes, novedosas y correctas para la consecución de los objetivos propuestos. La utilización de la metodología se ha realizado de una forma rigurosa y exhaustiva y los resultados obtenidos son de gran importancia para el avance en el diagnóstico de este conjunto de enfermedades, aportando nuevas herramientas diagnósticas que permitan la mejor detección de los parásitos implicados y un mejor diseño y evaluación de las medidas de control para su erradicación.

Es de destacar también que este estudio abre nuevas vías de investigación para analizar y evaluar dichas herramientas en poblaciones con diferentes perfiles a las incluidas en esta memoria.

Summary

The diagnosis of soil-transmitted helminths by *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* and *Strongyloides stercoralis* is currently one of the great diagnostic challenges in parasitology, being also defined by the World Health Organization (WHO) as the most prevalent diseases within the Neglected Tropical Diseases (NTDs). Currently, diagnosis based on conventional parasitological techniques for hookworms, ascariasis and trichuriasis requires the development of more sensitive and specific diagnostic techniques for their proper detection and for better evaluation of control programs with mass administration of drugs established by the WHO. In the case of strongyloidiasis due to the form of presentation of the disease (chronic with a high percentage of asymptomatic), the lack of a gold standard reference technique and the frequency of its appearance in our country as one of the first causes of non-philic eosinophilia in immigrant populations and travellers to endemic areas, this challenge is even greater.

The objectives in which this doctoral thesis is framed respond, in a serious, novel and current way, to the problem of the diagnosis of these pathologies with which the sanitary personnel of the National Health System and the investigators whose line of work is directed to the study of these parasitosis find themselves.

The wide range of diagnostic techniques employed, as well as the tools used to reach them with high specificity and sensitivity are totally in line, novel and correct for the achievement of the proposed objectives. The use of the methodology has been carried out in a rigorous and exhaustive way and the results obtained are of great importance for the advance in the diagnosis of this group of diseases, providing new diagnostic tools that allow the best detection of the parasites involved and a better design and evaluation of the control measures for their eradication.

It should also be noted that this study opens up new venues of research to analyse and evaluate these tools in populations with different profiles than those included in this report.



1. Introducción

1. Introducción

1.1. Generalidades de las infecciones por geohelminetos.

En el año 1946, Norman Stoll en su discurso como presidente de la Sociedad Americana de Parasitólogos formuló la siguiente pregunta: “¿Cuántas helmintiasis humanas existen en el mundo?”. Setenta y tres años después no sabemos la respuesta. La única aproximación que encontramos es que existen más de 340 especies de helmintos asociadas a humanos (Coombs y Crompton, 1991), la mayoría zoonosis poco frecuentes, destacando trece de ellas como las especies más comunes: *Fasciolopsis buski*, *Echinostoma* spp., *Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*, *Diphyllobothrium latum*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* (Hall et al., 2008), siendo estas cinco últimas las consideradas como geohelminetos o helmintos transmitidos por el suelo (*Soil transmitted helminths* o STHs), aunque sólo para *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, y para las uncinarias *A. duodenale* y *N. americanus* existen programas de control con administración masiva de fármacos ya que están incluidas dentro de la lista de las 20 enfermedades tropicales desatendidas o *neglected tropical diseases* (NTDs), elaborada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2003 y reelaborada en 2017. Estas enfermedades son endémicas en 149 países de los 194 reconocidos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU), y en al menos 100 países coexisten 2 o más de ellas. Se denominan NTDs debido a que: i) su presencia es mayoritaria en regiones de clima templado con niveles socioeconómicos bajos y ii) no reciben tanta atención como otras enfermedades que afectan a un menor número de personas en países con mejores condiciones de vida (WHO, 2010). A pesar de que *S. stercoralis* cumple con los dos requisitos previos, la OMS no lo incluye dentro de la lista ya que el tratamiento necesario para combatir la infección es diferente al utilizado para el resto de geohelminetos y porque requiere para su correcta detección técnicas de diagnóstico diferentes, lo que lleva asociado una subestimación de la enfermedad (Krolewiecki et al., 2013).

Dentro de las NTDs, las geohelmintiasis son las más prevalentes por encima de la esquistosomiasis o las filariasis linfáticas y a su vez son las que causan mayor morbilidad. A pesar de que generalmente no derivan en muerte, una alta carga de estos parásitos, especialmente en niños, tiene graves consecuencias, provocando anemia y afectando principalmente al crecimiento y al desarrollo intelectual, resultando, según los últimos estudios, en aproximadamente unos 6 millones de años de vida ajustados por discapacidad o DALYs (*Disability Adjusted Life Years*) (Pullan et al., 2014) (De Vlas et al., 2016) (Weatherhead et al., 2017). En el presente trabajo se ha incluido dentro del grupo de geohelminetos a estas

cuatro especies *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *A. duodenale*, *N. americanus* y a *S. stercoralis* (Muller, 2002), y se ha excluido del estudio a *E. vermicularis*, ya que aunque el ser humano actúa como hospedador definitivo el conocimiento que se tiene de esta parasitosis es mayor por su fácil diagnóstico y tratamiento.

Los nematodos, metazoos invertebrados donde se incluyen los geohelminetos, son organismos pseudocelomados, no segmentados, alargados, cilíndricos y con simetría bilateral. La parte exterior de su cuerpo forma una cutícula en tricapa (cortical, matriz y basal), con un importante papel en la osmorregulación, regulación iónica y nutrición (Noble y Noble, 1976). Su sistema digestivo es completo ya que poseen un tubo digestivo constituido por el esófago que se abre en el intestino y termina en el ano, situado ventralmente cerca del extremo posterior (Ash y Orihel, 2010). El sistema nervioso está desarrollado con un anillo circunfaríngeo. Existen cuatro fases larvares (L1-L4) hasta el desarrollo de los adultos dioicos y generalmente la larva del tercer estadio (L3) es la responsable de la infección de un nuevo hospedador. Las larvas tienen dos extremos, uno anterior redondeado y uno posterior que bien puede terminar de forma roma o en punta (Muller, 2002).

Desde un punto de vista taxonómico *Ascaris* spp., las uncinarias y *Strongyloides* spp. pertenecen a la clase Chromadorea (Secernentea) y *Trichuris* spp. a la clase Enoplea (Adenophorea). La principal diferencia entre estas dos clases taxonómicas es morfológica. La clase Chromadorea se caracteriza por la presencia de pequeños quimiorreceptores (fásmidios, anfidios y deridios), un sistema excretor tubular característico, los machos poseen un testículo y pueden presentar o no papilas caudales; mientras que la clase Enoplea posee anfidios postlabiales, carece de fásmidios y deridios, no siempre poseen sistema excretor y cuando está presente éste es sencillo y no tubular, los machos tienen dos testículos y no presentan papilas caudales (Ferris, 2008).

Los geohelminetos objeto del presente estudio se encuentran ubicados en estas dos clases, tal y como aparece reflejado en la siguiente clasificación taxonómica, referenciada en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) en el área de taxonomía con los números de acceso 6252, 6248, 51022, 51031 y 36087, respectivamente:

- Clase: Chromadorea
 - Orden: Rhabditida
 - ◇ Familia: Ascarididae
 - Género: *Ascaris*
 - ❖ Especie: *Ascaris lumbricoides*
 - ◇ Familia: Strongyloididae
 - Género: *Strongyloides*
 - ❖ Especie: *Strongyloides stercoralis*
 - ◇ Familia: Ancylostomatidae
 - Género: *Ancylostoma*
 - ❖ Especie: *Ancylostoma duodenale*
 - Género: *Necator*
 - ❖ Especie: *Necator americanus*
- Clase: Enoplea
 - Orden: Trichinellida
 - ◇ Familia: Trichuridae
 - Género: *Trichuris*
 - ❖ Especie: *Trichuris trichiura*

1.1.1. *Ascaris lumbricoides* y ascariasis.

1.1.1.1. *Ascaris lumbricoides*.

En humanos la infección generalmente está causada por *A. lumbricoides* (Linnaeus, 1758) ya registrado en el antiguo Egipto, tanto en el papiro de Ebers, donde se comenta su existencia y se incluyen recetas para su tratamiento con un vermífugo obtenido de la corteza de la raíz de la granada (medicamento utilizado hasta la mitad del siglo XX), como en momias egipcias de los años 800 a 300 a.C. Sin embargo, ya se sabe de su existencia en fechas anteriores dado que se han encontrado huevos en coprolitos humanos en Perú, con una antigüedad que data aproximadamente del año 2.277 a.C. También encontramos referencias a este parásito en escritos de médicos egipcios, chinos y griegos de diferentes épocas como Hipócrates, Aristóteles o Plinio. En la época romana, era conocido como *Lumbricus teres* (Shore García, 2007), confundiéndose durante muchos años con la lombriz de tierra (*Lumbricus terrestris*), y no fue hasta el año 1683 cuando un médico británico, Edward Tyson, estudió y comparó la anatomía de los dos helmintos, dando por finalizado este equívoco. Este error no fue el único, puesto que en un inicio se pensó que la hembra era vivípara y que por tanto salían directamente de ella las larvas hasta que, en el año 1856, Bryton Ramson, asoció los

huevos en las materias fecales con la presencia de parásitos adultos. Años más tarde, en 1862, un médico francés, Casimir Joseph Davaine, trató sin éxito de infectar diferentes animales con huevos larvados de *Ascaris* spp. y concluyó que probablemente para ello debería existir un hospedador intermediario, posiblemente un miriápodo o ciempiés. En el año 1881, un científico italiano Giovanni Battista Grassi trató, con más acierto que el anterior, de definir el mecanismo de transmisión, infectándose, en este caso a sí mismo, ingiriendo una gran cantidad de huevos, aproximadamente 100 huevos embrionados, encontrando posteriormente huevos en sus heces (Cox, 1996). En 1915, Stewart FH, en Hong Kong, estableció el paso de las larvas por los pulmones tras sus experimentaciones con cerdos y ratones (Stewart, 1916). En 1922, una pediatra japonesa, Shimesu Koino, después de ingerir alrededor de 2.000 huevos embrionados, encontró larvas en su esputo 11 días después de su ingestión presentando dificultad respiratoria severa, con fiebre y cefalea. A los quince días de estos síntomas, tomó un antihelmíntico y eliminó más de 600 parásitos adultos en sus heces, estableciendo el ciclo completo del parásito (Kino, 1922).

En relación al parásito *A. lumbricoides* podemos describir diferentes estadios parasitarios.

- Huevos:
 - El huevo fecundado es típicamente de color pardo amarillento debido al pigmento biliar absorbido en las heces, con cubierta gruesa mamelonada que en algunos casos está ausente (huevo decorticado). Miden de 55 a 75 μ m por 35 a 50 μ m y se encuentran en estadio unicelular cuando se eliminan en las heces.
 - El huevo no fecundado es alargado y provisto de una cubierta delgada, con la capa mamelonada que varía desde mamelones irregulares hasta una capa relativamente lisa en la que faltan casi por completo los mamelones. Son de mayor tamaño que los fecundados con 85 a 95 μ m por 43 a 47 μ m y el contenido interno es una masa de gránulos refringentes y desorganizados (Ash y Orihel, 2010).
- Larvas: las larvas del primer y segundo estadio (L1 y L2) se encuentran en el huevo, mientras que las mudas de éstas a L3 y L4 se producen en el hospedador vertebrado (ser humano).
- Adulto: el parásito adulto presenta una cabeza provista de una boca con 3 labios bien diferenciados con diminutos dientes o dentículos.
 - Los machos miden de 15 a 30 cm por 2 a 3 mm y presentan el extremo posterior con curvatura en posición ventral. Los órganos genitales masculinos forman un tubo enrollado situado en la mitad posterior del cuerpo, que consiste en testículos,

túbulos colectores y conductos eyaculatorios, provistos de un par de espículas retráctiles que facilitan la copulación. Presenta numerosas papilas antes y después del ano ([Noble y Noble, 1976](#)).

- Las hembras miden de 20 a 35 cm por 3 a 6 mm y poseen extremo posterior recto, sin enrollamiento. La vulva se encuentra cerca de la unión de los tercios anterior y medio del cuerpo y conduce a la vagina, que se ramifica para formar túbulos genitales pareados. Cada túbulo consiste en un receptáculo seminal, oviducto, ovario filiforme y útero ([Noble y Noble, 1976](#)). El útero es más ancho que las otras partes del túbulo y aloja los huevos.

En referencia a su ciclo biológico, los adultos, tanto hembra como macho, habitan en el lumen del intestino delgado humano, donde se nutren del alimento semi-digerido del hospedador. Es en este lugar donde copulan y la hembra deposita los huevos, aproximadamente unos 200.000 al día ([Sinniah, 1982](#)), que son liberados junto con las heces al exterior. Estos huevos no están embrionados pero bajo ciertas condiciones de humedad, temperatura (15-30 °C), suelos arcillosos, poca luz y oxígeno, el huevo sufre una división blastomérica que evoluciona hacia una larva de primer estadio (L1). Después de 2 a 4 semanas la L1 experimenta el proceso de muda y se convierte en una larva de segundo estadio (L2). Los huevos conteniendo la larva L2 son la forma infectante para el humano. Debido a sus capas protectoras son muy resistentes a la desecación y a la temperatura, por lo que pueden permanecer viables varios años en ambientes adversos ([Krasnonos, 1978](#)) ([Anderson, 1992](#)).

Los huevos infectantes al ser ingeridos por el ser humano llegan al duodeno donde eclosionan. La larva L2 perfora la cubierta por uno de sus polos, penetra en la pared intestinal alcanzando los vasos mesentéricos y llega al hígado. La larva permanecerá allí de 3 a 5 días, desarrollándose el tercer estadio larvario (L3). Su migración continúa por las venas suprahepáticas, vena cava inferior, aurícula y ventrículo derecho y arterias pulmonares hasta llegar a los alveolos, donde se transformará en el cuarto estadio larvario (L4). De ahí asciende por los bronquios hacia la tráquea para ser deglutida pasando por el esófago, hasta llegar al intestino delgado donde madurará a adulto. Aproximadamente 2 meses post-infección se pueden encontrar huevos en las heces ([Tay, 1993](#)).

1.1.1.2. Ascariasis.

Una de las primeras consecuencias que puede ocurrir tras la infección es la formación de granulomas eosinofílicos en el hígado como consecuencia de la muerte de las larvas durante la migración. Posteriormente, coincidiendo con el paso de las larvas por el pulmón, se

puede producir una intensa respuesta inflamatoria caracterizada por fiebre, tos no productiva, disnea e infiltrados pulmonares conocida como síndrome de Löffler o neumonía eosinofílica, ya que estos síntomas van asociados con una eosinofilia marcada, así como con una reacción urticariforme o edema, sobre todo si ha existido una sensibilización previa. Las manifestaciones de la ascariasis intestinal dependen de la carga parasitaria. Con frecuencia es asintomática y si la carga es moderada pueden aparecer trastornos digestivos inespecíficos: náuseas, vómitos, dolor abdominal y episodios diarreicos esporádicos. Durante esta fase intestinal la eosinofilia disminuye, e incluso desaparece. Si la parasitación es elevada se puede producir distensión abdominal, dolor y, sobre todo en infección infantil, un cuadro de oclusión intestinal. En niños pequeños, si los parásitos adultos se acumulan en el íleon pueden ocasionar una obstrucción parcial ya que el lumen es pequeño, además de causar invaginación y estrangulación intestinal que puede provocar necrosis que conlleva riesgos de perforación intestinal y peritonitis (Yetim, 2009). Los adultos pueden penetrar en el apéndice produciendo un cólico agudo y gangrena del mismo, resultando en un cuadro clínico indistinguible de la apendicitis. Se han reportado casos de intolerancia a la lactosa y malabsorción de la vitamina A asociados a infecciones por *A. lumbricoides* (Hall et al., 2008). Por otro lado, en presencia de fiebre alta, los adultos tienden a moverse apareciendo en ano o nasofaringe. De forma menos frecuente, y más común en adultos, se han descrito cuadros de cólico biliar, colecistitis, colangitis, pancreatitis y abscesos hepáticos, como consecuencia de un bloqueo del orificio del conducto biliar por la entrada de los adultos en el duodeno (Grover, 2001) (Alvaro, 2008).

1.1.2. *Trichuris* spp. y tricuriasis.

1.1.2.1. *Trichuris trichiura*.

El principal causante de la infección en el humano es *T. trichiura* (Roedere, 1761), cuyo primer registro data de Morgan, un científico italiano que identificó en 1740 la presencia del parásito en el colon, aunque el estudio de momias ha permitido conocer su presencia en América Precolombina y Eurasia alrededor del 3.300 a.C. (Aspöck, 1996). También, en excavaciones realizadas en Namur (Bélgica), se han encontrado huevos que datan de la época Galo-Romana (600 a.C. hasta 200 d.C.). En Chile, en una momia inca del siglo XV d.C. encontrada a 5.355 m de altura, se observaron en el recto huevos de *T. trichiura* en perfecto estado de conservación. En 1761 Roedere, físico alemán, determinó su morfología y en 1771 Linneo lo catalogó. El ciclo vital de este organismo fue descrito por primera vez por Grassi (1887) y después lo completaron Fülleborn (1923) y Hasegawa (1924) (Aspöck, 1996).

En cuanto a la morfología a continuación se describen las formas parasitarias:

- Los huevos miden de 50 a 54 μm por 23 μm . Tienen forma de barril, de color marrón debido al pigmento biliar, con dos capas, exterior e interior, y unas prominencias polares transparentes con alto contenido en quitina (Muller, 2002).
- Larvas: las larvas L1 a L4 se desarrollan en el intestino del hospedador humano a partir del huevo embrionado.
- Adulto: este parásito también se conoce como *whipworm*, cuya traducción literal sería la de “gusano látigo” o tricocéfalo debido a que posee una parte anterior delgada y una posterior más ancha, confiriendo a los adultos esa forma característica. El esófago se encuentra en la porción anterior estrecha y el ano en la posterior más gruesa. El esófago es simple, no muscular, se extiende dos tercios desde el extremo anterior y está recubierto por una serie de glándulas unicelulares conocidas como esticocitos que poseen funciones de secreción, comunicación y soporte, y conforman el esticosoma (Muller, 2002).
 - El macho mide de 30 a 45 mm por 0,6 mm con el extremo caudal enrollado ventralmente. En el extremo posterior del cuerpo sobresale una espícula a través de la vaina cuticular espinosa y retráctil (Noble y Noble, 1976).
 - La hembra mide de 35 a 50 mm por 0,7 mm. La vulva se encuentra en el extremo anterior del cuerpo y se abre en la unión del esófago e intestino (Noble y Noble, 1976). El útero, situado en la porción posterior, puede contener alrededor de 60.000 huevos a la vez (Muller, 2002).

En el ciclo de vida, las hembras adultas de *T. trichiura* habitan en la mucosa del ciego y depositan diariamente entre 2.000 y 20.000 huevos (Bundy y Cooper, 1989). Los huevos no embrionados son expulsados juntos con las heces y depositados en el suelo. Es necesario que se den unas buenas condiciones ambientales de humedad y que no se encuentren expuestos directamente al sol para que se desarrollen (14-21 días aproximadamente), siendo por tanto la temperatura un elemento determinante (4-6 meses a 15 °C; 3-4 semanas a 26 °C; 17 días a 30 °C y 11 días a 35 °C) y presentando éstos capacidad de sobrevivir en el suelo durante varios años (Muller, 2002). Los huevos embrionados son ingeridos por el ser humano desplazándose por el tubo digestivo hasta el intestino delgado, donde las larvas romperán las prominencias mucosas del huevo y utilizarán la microflora intestinal y los nutrientes para multiplicarse y crecer. Estas larvas del primer estadio (L1) penetrarán en las glándulas de Lieberkühn descendiendo hasta el ciego y la parte superior del colon donde madurarán y se transformarán en adultos (Beer, 1973). Los adultos sobreviven gracias a la creación de túneles epiteliales

formados mediante un proceso de fusión de la célula huésped en respuesta a proteínas derivadas del parásito. La porción posterior del parásito, más ancha, rompe la pared del túnel epitelial para sobresalir a la luz. Los adultos copulan utilizando la porción posterior de sus cuerpos que queda libre hacia el lumen ([Bogitsh, 2005](#)). La hembra adulta deposita los huevos transcurridos unos 60 o 70 días después de la infección y son viables de uno a dos años.

1.1.2.2. Tricuriasis.

Las infecciones leves producidas por *T. trichiura* son asintomáticas y las moderadas se caracterizan por diarrea ocasional, dolor tipo cólico y en las fases iniciales de la enfermedad puede aparecer eosinofilia de hasta el 25%. Sin embargo, en las infecciones masivas se observa diarrea (con presencia de moco y sangre en las heces), tenesmo, colitis crónica similar a la enfermedad de Crohn, dolor abdominal y prolapso rectal, principalmente en niños malnutridos. Esta infección provoca retraso del crecimiento en la población infantil, perjudicando así la cognición y el rendimiento escolar ([Simeon et al., 1994](#)) ([Cooper et al., 1995](#)). La formación de úlceras, como consecuencia de la fijación del parásito, además de producir pérdida directa de sangre (0,005 ml/adulto/día) que conlleva a desarrollar anemia ferropénica, predispone a la disentería amebiana ya que proporcionan un sitio adecuado para la invasión por *Entamoeba histolytica* ([Muller, 2002](#)). De forma poco frecuente se han descrito casos de apendicitis o formación de granulomas debido a la inflamación e irritación del lumen del apéndice en presencia de altas cargas parasitarias ([Muller, 2002](#)).

1.2.3. *Ancylostoma duodenale*/*Necator americanus* y uncinariasis.

1.2.3.1. *Ancylostoma duodenale*/*Necator americanus*.

Las principales especies causantes de las uncinariasis en el ser humano son *A. duodenale* (Dubini, 1843) y *N. americanus* (Stiles, 1902), conocidas como uncinarias. En el caso de las uncinarias se han encontrado huevos de *Ancylostoma* spp. en un coprolito humano que data del año 3.350 a.C., aunque también se menciona en el papiro de Ebers y en la obra de Hipócrates. La enfermedad era conocida en Egipto y Europa como “clorosis egipcia” debido al color grisáceo que tomaba la piel ([Cox, 1996](#)) y los campesinos colombianos se referían a ella como “tuntún”, apelativo onomatopéyico derivado de la cefalea, una sensación de golpe repetido por la pulsación de las arterias craneales debido a la anemia ([Robledo-Villegas y Posada Arango, 1995](#)). En Brasil, se encontraron huevos y larvas de la especie *A. duodenale* en momias humanas datadas de los años 430 y 340 a.C. y en China, en el siglo III a.C. se hablaba de esta enfermedad como la causa de la pereza y del color amarillo de la piel en los trabajadores enfermos. También se han encontrado huevos de *A. duodenale* en momias peruanas de los años 890 a 950 d.C. Fue Avicena quién describió por primera vez estos

parásitos y sugirió como tratamiento el extracto de helecho macho. Sin embargo, el hallazgo de Avicena quedó silenciado hasta 1842, cuando un médico italiano, Angelo Dubini, en Milán, encontró estos parásitos en una autopsia, y los clasificó como *Agchylostoma duodenale*, cuyo género cambio luego por *Ancylostoma* que quiere decir “boca de ganchos”. Unos años más tarde, en 1854 un psiquiatra alemán, Wilhelm Griesinger, estableció la relación entre estos nematodos y la enfermedad que provocaban. En 1879, cuando se trabajaba construyendo el túnel de San Gotardo en los Alpes suizos, ocurrieron 117 muertes por uncinarias, lo cual obligó a suspender los trabajos y se estableció la relación entre la presencia de los parásitos y la anemia. El ciclo de vida se descubrió a comienzos del siglo XX, cuando Loss tuvo una infección accidental en Egipto al realizar experimentos con larvas de *Ancylostoma*. Tiempo después, Giovanni Battista Grassi (1889) demostró la presencia de huevos de uncinarias en las heces humanas y propuso este método para el diagnóstico de la parasitosis. Según los registros, la especie *A. duodenale* es originaria de Asia, mientras que *N. americanus* de África, aunque hay evidencia de que este último llegó a América hace más de 5.000 años.

Ambos presentan diferentes formas parasitarias que se describen a continuación.

- Los huevos miden de 56 a 60 μm por 34 a 40 μm , indistinguibles entre ambos parásitos, son ovalados con una envoltura delgada y transparente.
- Larvas
 - Rabditiformes: similares en ambos parásitos, son móviles y miden aproximadamente 250 μm de largo. El extremo anterior es romo con una cápsula bucal larga, seguida de un esófago muscular donde se distinguen tres partes: el cuerpo, el istmo y el bulbo. El intestino también es visible y termina en el ano. El primordio del órgano genital es puntiforme y su extremo posterior es puntiagudo. Estas larvas se denominan rabditiformes porque la estructura del esófago se asemeja a la del nematodo de vida libre *Rhabditis*.
 - Filariformes: son la forma infectiva, exhiben una gran movilidad y miden casi el doble que las larvas rabditiformes, alrededor de 500 μm de longitud. El esófago es filariforme y presenta una pequeña protuberancia en su unión con el intestino (Udonsi y Atata, 1987).
- Adulto: los parásitos adultos de ambas especies presentan una morfología cilíndrica similar, con la parte anterior curvada en forma de “gancho” (*hook*), de ahí que se les conozca como *hookworm*, muy prominente en el caso de *N. americanus* y no así en *A. duodenale*. En el caso de *N. americanus* la cápsula bucal es esférica y presenta unas

láminas cortantes semilunares, en cambio, en *A. duodenale* es elongada, con forma de pera y tiene dos pares de dientes.

- *A. duodenale*
 - El macho mide de 8 a 11 mm por 0,45 mm. La bursa es extendida, más ancha que larga.
 - La hembra mide de 10 a 13 mm por 0,6 mm. La vulva se localiza en la parte media posterior.
- *N. americanus*
 - El macho mide de 9 a 11 mm por 0,35 mm. La bursa es estrecha, más larga que ancha.
 - La hembra mide de 10 a 13 mm por 0,6 mm. La vulva se localiza en la parte media anterior.

En el caso del ciclo de vida de *A. duodenale* la hembra adulta produce en el intestino delgado unos 30.000 huevos al día y en el caso de *N. americanus* de 5.000 a 10.000. En ambas especies, los huevos son liberados junto con las heces al exterior, donde madurarán en el suelo siempre y cuando las condiciones de temperatura y humedad sean favorables. Estos huevos eclosionarán dando lugar a larvas rhabditiformes (L1) y éstas madurarán a una etapa juvenil (L2). Tanto L1 como L2 son larvas no infectantes y se alimentan de bacterias y residuos orgánicos del suelo. Las larvas L2 se transformarán en larvas filariformes (L3) las cuales son infectivas al ser capaces de penetrar a través de la piel. Durante este último estadio no se alimentan pero son móviles y se desplazan a las capas superiores del suelo para aumentar la posibilidad de contacto con la piel humana, estando presentes sobre todo en los primeros 2 cm de tierra ([Muller, 2002](#)). Para su penetración, es necesario la ayuda de enzimas proteolíticas como hialuronidasa y metaloproteasas que impiden la adhesión de las células de la dermis por degradación del colágeno, fibronectina, laminina y elastina de la matriz extracelular de la piel, permitiendo la migración de la larva por ella ([Schneider et al., 2011](#)). Después de la penetración de la piel, ingresan en las vénulas subcutáneas y en los vasos linfáticos para acceder a la circulación periférica del hospedador. Las larvas L3 llegarán a los vasos sanguíneos de la dermis y migrarán por vía venosa a los pulmones, penetrando en los alveolos, desde donde ascenderán a la tráquea para ser deglutidas y alcanzarán el intestino delgado. Durante la migración sufren otras 2 mudas madurando al estado adulto. Las uncinarias adultas son maduras sexualmente al cabo de 3 a 5 semanas post-infección, momento en que las hembras empiezan a producir los huevos que aparecerán en las heces. Hay que destacar que *N. americanus* es infectivo sólo por vía cutánea, mientras *Ancylostoma*

spp. también lo es mediante la ingestión de sus larvas L3, no existiendo en este caso una fase pulmonar. Se ha postulado también la transmisión lactogénica durante la lactancia (Prieto-Pérez *et al.*, 2016).

1.2.3.2. Uncinariasis.

En el caso de las infecciones por uncinarias la sintomatología también está directamente relacionada con la carga parasitaria y en infecciones leves los pacientes son asintomáticos. De acuerdo a las distintas etapas de invasión del parásito, los síntomas que se presentan son cutáneos, pulmonares e intestinales. En los sitios de penetración de las larvas, principalmente, manos, piernas y pies, podemos encontrar lesiones cutáneas pruriginosas (Schneider *et al.*, 2011), que puede conllevar a una infección secundaria con dermatitis papulovesicular (Muller, 2002). Debido a la migración de las larvas por los pulmones puede producirse un cuadro semejante al síndrome de Löffler con fiebre, tos, disnea y sibilancias. En esta fase suele haber eosinofilia y pueden presentarse cuadros de neumonitis o bronquitis. Cuando la infección por *A. duodenale* se produce vía oral, las migraciones de las larvas provocan un síndrome conocido como enfermedad de Wakana caracterizado por náuseas, vómitos, tos, disnea, irritación faríngea, afonía y eosinofilia. En cuanto a los síntomas digestivos se observa dolor abdominal, diarrea, náuseas y pérdida de peso. El signo clínico principal y más frecuente en esta fase es la anemia ferropénica, consecuencia de la hemorragia intestinal crónica que sufren los pacientes por la fijación de los gusanos adultos a la mucosa intestinal mediante su aparato bucal. La pérdida de sangre diaria provocada por un adulto de *N. americanus* es de 0,03 a 0,05 ml y por *A. dudodenale* es mayor (0,14-0,25 ml), aunque en ambos casos se produce una reabsorción de la hemoglobina en el intestino. A la anemia se le unen además otros síntomas como la apatía, palidez, síncope y angina de pecho. No existe una clara relación entre la presencia de uncinarias y la disminución en el proceso de hematopoyesis, pero sí se ha demostrado que son capaces de disminuir la vida media de los eritrocitos además de captar proteínas plasmáticas, principalmente la albúmina, que trae como consecuencia la aparición de edema asemejándose a un síndrome nefrótico, hecho especialmente presente cuando el hospedador no ingiere la cantidad suficiente de hierro (Muller, 2002). El extenso daño a la mucosa puede producir necrosis asociada a un déficit de vitamina B12 y ácido fólico, y se ha descrito una relación directa de la infección con el síndrome de malabsorción (Haswell-Elkins *et al.*, 1987). En niños se ha descrito retraso en el crecimiento y hay evidencia de que la infección también disminuye la capacidad cognitiva (Sakti *et al.*, 1999).

1.2.4. *Strongyloides* spp. y estrongiloidiasis.

1.2.4.1. *Strongyloides stercoralis*.

Existen dos especies, *S. stercoralis* y *S. fuelleborni*, causantes de la infección en humanos, siendo la primera especie la más frecuente (Bavay, 1876). En un primer momento denominada “anguilulosis”, fue descubierta en 1876 por Louis Alexis Normand, un médico de la marina francesa, en un grupo de soldados que había regresado de la Cochinchina (actual Vietnam) y que presentaban un cuadro clínico diarreico. Por ello, en un principio esta parasitosis también era conocida como “diarrea de Cochinchina”, pero hasta 50 años después no se pudo describir el ciclo completo del parásito causante. Como hechos destacados, de 1900 a 1914, Askanazy, Durme, Loos, Ransom y Fülleborn describieron las vías de invasión y su ciclo biológico; en 1926, Fülleborn demostró la autoinfección en la piel perianal; y de 1933 a 1935, Faust corroboró la posibilidad de hiperinfección intestinal (Grove, 1996).

A continuación se detallan los diferentes estadios que presenta este parásito.

- Huevos: miden de 50-60 μm por 30-35 μm , son ovoides con envoltura delgada y transparente.
- Larvas:
 - Rabditiformes: miden 250 μm de largo, diferenciables de las larvas de uncinarias porque presentan una cápsula bucal más corta.
 - Filariformes: son la forma infectiva y miden el doble (550 μm de largo) que las larvas rabditiformes, al igual que ocurre en las larvas de uncinarias pero difieren de éstas en la falta de vaina, la presencia de una pequeña hendidura en la punta de la cola y la mayor longitud de la faringe.
- Adulto: La cutícula está finamente estriada y la cola es puntiaguda. El esófago ocupa el tercio anterior del cuerpo y se une al intestino medio, que se abre en el ano ventral a una corta distancia del extremo posterior.
 - Hembra: La hembra de vida libre es más corta (1 mm) y más robusta que la forma parasitaria (2-3 mm) y tiene un esófago rabditiforme corto, muscular y con un bulbo posterior agrandado, similar al de *Rhabditis*. La vulva se abre ventralmente en la unión de los tercios medio y posterior. El útero, los oviductos y los túbulos ováricos están emparejados, una de las ramas se extiende hacia adelante desde la vulva y la otra hacia atrás (Muller, 2002).

- Macho: El macho de vida libre mide entre 0,4-0,7 mm y tiene una cola puntiaguda con dos espículas y un gubernáculo que facilita la copulación. El esófago es rabadiforme. No existen machos adultos parásitos.

El ciclo biológico puede seguir dos pautas de desarrollo: un ciclo directo u homogónico (parasítico) o un ciclo indirecto o heterogónico (de vida libre) ([Grove, 1996](#)).

En el ciclo directo, las hembras parásitas adultas habitan en el intestino delgado. La ovoposición tiene lugar en el epitelio o incluso en la submucosa, donde los huevos se transformarán en larvas rabadiformes (L1) y migrarán hacia el lumen intestinal para ser eliminadas con las heces. Estas larvas sufren dos mudas sucesivas hasta convertirse en larvas filariformes (L3), las cuales son infectivas para el ser humano, se alimentan de bacterias en el suelo y si las condiciones ambientales son óptimas pueden vivir alrededor de 2 semanas. La infección comienza cuando las larvas L3, presentes en el suelo, penetran a través de la piel del hospedador (normalmente por los pies o más raramente por la mucosa bucal) con la ayuda de enzimas (principalmente metaloproteasas). Atraviesan los capilares sanguíneos y linfáticos, ascienden hasta el corazón y a través de las arterias pulmonares llegan a los pulmones, donde mudan a L4. De allí pasan a la tráquea, son deglutidas, y alcanzan el duodeno-yeyuno, donde se transformarán en hembras adultas partenogenéticas que producirán huevos aproximadamente a los 17 días post-infección. En esta fase parasitaria no se encuentran machos.

En el ciclo indirecto, las larvas rabadiformes (L1) sufrirán cuatro mudas transformándose en hembras y machos adultos de vida libre, siempre y cuando las condiciones externas, en términos de humedad, temperatura y nutrientes, principalmente, sean adecuadas. Tras la cópula las hembras pondrán huevos en el suelo. Estos huevos eclosionarán pocas horas después dando lugar a larvas rabadiformes, las cuales podrán seguir un ciclo directo o indirecto. Las condiciones adversas (como suelos ácidos o anegados, temperaturas fuera del rango entre 20 °C y 37 °C y carencia de alimentos) inhiben el desarrollo de las larvas hasta adultos de vida libre permaneciendo como formas infectantes; por el contrario, las condiciones adecuadas favorecen el desarrollo de las larvas hasta adultos produciendo el ciclo de vida libre.

En el ser humano podemos distinguir dos formas de infección endógena diferentes debido a la capacidad del parásito de reproducirse dentro del hospedador sin necesidad de salir al exterior provocando: i) infecciones crónicas en el hospedador (autoinfección) y ii) cuadros clínicos graves (hiperinfección), por el debilitamiento del sistema inmune del

hospedador. La hiperinfección se produce cuando el paciente con estrongiloidiasis crónica o una primoinfección sufre una inmunosupresión de manera que el ciclo del parásito se acelera, aumentando la carga parasitaria, lo que puede llevar a provocar una infección diseminada. En la autoinfección las larvas rhabditiformes, tras dos mudas, se transforman en larvas filariformes en el intestino y pueden penetrar en la mucosa intestinal (autoinfección interna) o atravesar la piel de la región perianal (autoinfección externa); en ambos casos llegarán a los pulmones y tras su deglución pasarán al intestino. Este proceso explica que la enfermedad pueda persistir durante décadas sin necesidad de una nueva exposición (Muller, 2002).

1.2.4.2. Estrongiloidiasis

La mayoría de los pacientes permanecen asintomáticos y pueden mantenerse así durante muchos años. Sin embargo, tras la penetración cutánea de las larvas puede aparecer prurito y edemas locales, aunque estas lesiones pueden pasar inadvertidas. El síndrome cutáneo de *larva currens* (tractos serpiginosos urticariformes y pruriginosos) es típico de la primoinfección, debido a la migración de las larvas por la piel, principalmente presente en nalgas, ingles y/o tronco. La etapa pulmonar se caracteriza por un cuadro que recuerda al síndrome de Löffler con eosinofilia. La intensidad de la patología intestinal está en relación directa con el número de parásitos existentes, con dolor epigástrico, náuseas, vómitos, anorexia, diarrea y eosinofilia. En el caso de la hiperinfección, en ocasiones potenciada por una disminución en la movilidad del intestino, la sintomatología pulmonar se agrava con bronconeumonía y hemorragias intraalveolares, y la intestinal se exacerba con diarrea esteatorreica, instaurándose un cuadro de enteritis con malabsorción y un desequilibrio electrolítico (Muller, 2002) que puede ir acompañado de infección bacteriana. Si las larvas se acumulan en los vasos linfáticos pueden causar una linfangitis granulomatosa, este hecho puede conllevar una fibrosis y una pérdida en la elasticidad del abdomen. Se han descrito casos también de íleo paralítico, meningitis, abscesos y septicemia. En niños, aunque la infección es menos frecuente, puede tener consecuencias graves como el desarrollo de la enfermedad de Kwashiorkor o el síndrome de emaciación (Muller, 2002). La estrongiloidiasis diseminada debida a la invasión por las larvas de otras vísceras u órganos (riñón, corazón, páncreas) produce una sintomatología de acuerdo a los sitios afectados y es frecuente en pacientes con leucemia, en tratamiento inmunosupresor después de un trasplante o que sufran malnutrición (Krolewiecki et al., 2013). Se ha descrito que en presencia de corticosteroides se estimula la producción de hormonas de muda del parásito (principalmente ecdisona) favoreciendo su desarrollo. Existe una clara relación de este parásito con la infección por VIH (Schar et al., 2013) así como por HTLV-1 (Salvador et al., 2017).

1.2. Epidemiología de las geohelmintiasis.

1.2.1. Las geohelmintiasis en países endémicos.

Las geohelmintiasis prevalecen y son endémicas principalmente en áreas desprovistas de infraestructuras sanitarias, con viviendas precarias y entornos de pobreza. Más de 2.000 millones de personas en el mundo están infectadas por al menos una especie de este grupo de patógenos. Según las últimas estimaciones, 1.200 millones de personas están infectadas con *A. lumbricoides*, 800 millones con *T. trichiura* y 700 millones con uncinarias (*N. americanus* y/o *A. duodenale*) (Pullan *et al.*, 2014). Hay que destacar que estos datos no incluyen el número de infecciones por *S. stercoralis*, pero según la OMS hay entre 30 y 100 millones de personas afectadas, aunque los últimos datos publicados están más próximos al valor superior del intervalo (Schar *et al.*, 2013) (Puthiyakunnon *et al.*, 2014), haciendo especial énfasis en la falta de datos procedentes de zona endémica y en la certeza de que la prevalencia está subestimada.

Asia contribuye con casi el 70% de la prevalencia mundial de las geohelmintiasis, en el que 298, 140 y 101 millones de personas están infectadas con *A. lumbricoides*, *T. trichiura* y uncinarias, respectivamente (Pullan *et al.*, 2014). El número de casos está principalmente concentrado en los países del sur de Asia con una población total de 1.500 millones de habitantes, contribuyendo la India con el 21% de la prevalencia global de las STHs, seguido por China con un 18% (Pullan *et al.*, 2014), y describiéndose una prevalencia mayor generalmente en las zonas rurales frente a las urbanas (Nitin *et al.*, 2007). Después de estos dos países superpoblados, la mayor concentración de geohelmintiasis se encuentra en los países del sudeste asiático (Brunei, Camboya, Timor Oriental, Indonesia, República Democrática Popular de Lao, Malasia, Myanmar, Filipinas, Singapur, Tailandia y Vietnam). De entre ellos, actualmente Brunei y Singapur no se consideran endémicos, por lo que no tienen programas específicos de control para las geohelmintiasis (Anon, 2008). Sin embargo, en los años 60 Singapur presentaba unas altas tasas de prevalencia (Desowitz, 1963), que fueron disminuyendo gracias a la urbanización y a la mejora en las condiciones de vida. Por otro lado, Indonesia, Malasia, Filipinas y Tailandia, que sí cuentan con programas específicos de control, todavía a día de hoy reportan rangos de prevalencia para *Ascaris* spp. de 0-90%, 1-66%, 11-51% y 0-22%, para *Trichuris* spp. de 0-78%, 1-97%, 28-71% y 0-39%, y para uncinarias de 0-35%, 0-34%, 1-24% y 0-38%, respectivamente, encontrándose generalmente las cifras más bajas en Tailandia. Países como Camboya, República Democrática Popular de Lao, Myanmar y Vietnam, territorios que han sufrido una elevada inestabilidad política y presentan tasas de pobreza muy elevadas, cuentan con recientes programas de control presentando unos rangos

amplios de prevalencias para estas geohelmintiasis. Por último, en Timor Oriental, incluido como país independiente desde 2002 tras independizarse de Indonesia, sólo hay datos recogidos de prevalencia de *Ascaris* spp. (49%) y de uncinarias (67%), pero debido a su situación socio-económica y al clima se espera que éstas puedan ser más elevadas (Jex *et al.*, 2011). Datos similares se han descrito recientemente en el metanálisis realizado por Silver *et al.* (2018) sobre la prevalencia de geohelmintiasis en el sur y sudeste asiático, confirmándose que *A. lumbricoides* es el parásito más frecuente con una prevalencia del 18% seguida de *T. trichiura* y de uncinarias (Crowe *et al.*, 2014) (Belhassen-Garcia *et al.*, 2017b). La ascariasis aparece en esta revisión muy extendida en el sur del continente, siendo Myanmar y Filipinas los países más prevalentes y Tailandia, con un 1% de prevalencia, el menor. Por otro lado, la mayor proporción de individuos infectados con *T. trichiura* se encontró en Filipinas y Malasia y la más baja en Pakistán. El país con mayor prevalencia de uncinarias fue República Democrática Popular de Lao, seguido por Vietnam y Camboya, siendo los menos prevalentes Pakistán y Myanmar (Silver *et al.*, 2018).

Sin embargo, en cuanto a la estrongiloidiasis, se han reportado altas tasas de prevalencia en áreas rurales de Tailandia (7,7-53,8%) (Sithithaworn *et al.*, 2003) (Pinlaor *et al.*, 2005) y de Malasia (35,9%), siendo más bajas en República Democrática Popular de Lao (30,8%), Camboya (24,5%), Indonesia (5,2%) y China (6,4%) pero no se dispone de datos para esta geohelmintiasis en el resto de países del sudeste asiático (Longfils *et al.*, 2005; Widjana y Sutisna, 2000) (Sithithaworn *et al.*, 2006) (Chhakda *et al.*, 2006) (Sayasone *et al.*, 2009) (Copelovitch *et al.*, 2010) (Schar *et al.*, 2016).

Después del continente asiático, África es el siguiente en cuanto a contribución mundial de una mayor prevalencia de geohelmintiasis. Se estima que en África subsahariana hay aproximadamente 866 millones de personas infectadas y en el resto del continente unos 477 millones de personas (Pullan *et al.*, 2014). Las publicaciones existentes son escasas y las que hay están principalmente referidas al África subsahariana, con datos muy heterogéneos. El trabajo que hemos llevado a cabo en este estudio dentro del continente africano se ha realizado en tres zonas geográficas de África subsahariana: Etiopía, Angola y Mozambique, por lo que nos centraremos de forma más exhaustiva en los datos concernientes a estos países. Según datos de la OMS en el año 2017, de entre estos tres países subsaharianos, Etiopía es el país que presenta un mayor número de niños en edad escolar y pre-escolar que requieren tratamiento antihelmíntico, seguido de Mozambique y Angola (WHO, 2018).

Etiopía es un país que está catalogado por el Comité de Ayuda al Desarrollo como País Menos Adelantado, y ocupa el puesto 173 de un total de 189 países según el Índice de Desarrollo Humano de 2018. Tiene un clima tropical dependiente de la altitud, la estación de lluvia tiene lugar entre junio y septiembre y la estación seca, en ocasiones interrumpida, sucede en febrero o marzo. La ciudad de Bahir Dar pertenece a la región Amhara, al noreste del país, en las proximidades del Lago Tana, el lago más grande de Etiopía y fuente del Nilo Azul. Existen numerosos artículos de la presencia de geohelmintiasis en el país. De hecho, es considerado como uno de los países más afectados por helmintos, estimándose en más de 26, 21 y 11 millones las personas afectadas por *A. lumbricoides*, *T. trichiura* y uncinarias, respectivamente (Samuel *et al.*, 2017). En el año 2016, un estudio realizado con nuestra participación en población infantil en la misma zona geográfica objeto de nuestro estudio reveló que la prevalencia de estrongiloidiasis era del 20,7% al combinar técnicas parasitológicas (microscopía convencional y técnica de Baermann) con moleculares (PCR en tiempo real) y de más del doble (54,5%) para uncinarias al utilizar únicamente las técnicas parasitológicas, encontrando además coinfección en un 16,3% de los casos (Amor *et al.*, 2016). También fueron predominantemente descritas las uncinarias en un estudio realizado en niños de entre 7 a 14 años en Sebatamit (zona rural de Bahir Dar) con una prevalencia del 31,7% obtenida al utilizar el método de concentración de Ritchie, siendo menos prevalentes las infecciones por *A. lumbricoides* (1,2%) y *S. stercoralis* (0,2%) (Hailu, 2018). En un estudio en población infantil de escuelas ubicadas alrededor del Lago Tana se recogen porcentajes muy similares tras realizar una concentración formol-éter, siendo las geohelmintiasis más frecuentes las uncinarias con un 31,6% (Afework *et al.*, 2016). Estos datos también se reproducen en otros estudios en población infantil de la región de Amhara, donde la prevalencia de las uncinarias destaca frente al resto, seguida de las ascariasis y tricuriasis (Abdi *et al.*, 2017) (Nute *et al.*, 2018) (Leta *et al.*, 2018).

En el sur del país los datos recogidos apuntan hacia una menor prevalencia de las uncinarias, siendo superada por la ascariasis. En el año 2017, en un estudio realizado en población escolar de la ciudad de Ambo (región Oromia, próxima a la capital del país) se obtuvo una prevalencia de uncinarias del 2,8%, encontrando, al visualizar las muestras por microscopía tras una concentración formol-éter, como geohelminto más prevalente a *A. lumbricoides* (7,8%) y como menos a *T. trichiura* (2,2%) (Samuel *et al.*, 2017). Más al sur del país un estudio realizado alrededor del Lago Awassa en población de mayor edad (estudiantes de entre 10 y 15 años) reveló datos de prevalencia mayores para *A. lumbricoides* (44,4%) y para *T. trichiura* (11%) y menores para uncinarias (7,7%), utilizando la misma técnica (Tadege y

[Shimelis et al., 2017](#)). Más al sur de esta zona, en Yigacheffee, también se han obtenido prevalencias del 21,7%; 16,7% y 7,2% para *A. lumbricoides*, uncinarias y *T. trichiura* en población infantil en edad escolar ([Molla y Mamo, 2018](#)).

Hay que destacar que la gran mayoría de los trabajos llevados a cabo en este país tienen como objeto de estudio la población infantil, no habiendo prácticamente datos de lo que ocurre en la población general. Aun así, los datos disponibles apuntan a que de forma global las geohelmintiasis más predominantes son las uncinarias detectadas principalmente mediante técnicas parasitológicas. La estrongiloidiasis únicamente ha sido reportada en aquellos estudios en los que se utilizan técnicas parasitológicas más específicas para su diagnóstico como el método de Baermann o técnicas moleculares ([Krolewiecki et al., 2013](#)) ([Amor et al., 2016](#)).

Los datos existentes para los países fronterizos con Etiopía también son heterogéneos. Así, en un estudio realizado en el norte de Kenia en población infantil (5-12 años), se encontraron altas prevalencias por técnicas parasitológicas (Kato Katz) para uncinarias (81%), *T. trichiura* (88%) y *A. lumbricoides* (46%) ([Njaanake et al., 2016](#)). Sin embargo, en otro estudio en el sureste del país realizado también en menores de 18 años y aplicando la misma técnica de Kato Katz, las prevalencias obtenidas fueron considerablemente menores, del 6,1% para uncinarias y del 1,6% para *T. trichiura*, sin detectar además infecciones por *A. lumbricoides* ([Chadeka et al., 2017](#)). Los datos con los que se cuentan del oeste de Kenia se refieren a población adulta con unas prevalencias del 17% para *A. lumbricoides*, del 18% para *N. americanus*, y menores del 1% para *T. trichiura*, *A. duodenale* y *S. stercoralis* ([Easton et al., 2017](#)). En el sur de Sudán se ha descrito la presencia de uncinarias en población general ([Sturrock et al., 2009](#)). Sin embargo, no existen datos al respecto en Somalia y Eritrea.

Otro país africano objeto de nuestro estudio es Angola, considerado un País de Desarrollo Humano Bajo (ocupa la posición 147 de 189 países analizados según el Índice de Desarrollo Humano del 2018), y dividido en 18 provincias: Bengo, Benguela, Bié, Cabinda, Cuando-Cubango, Kwanza Norte, Kwanza Sul, Cunene, Huambo, Huila, Luanda, Lunda Norte, Lunda Sul, Malanje, Moxico, Namibe, Uige y Zaire. El principal biotopo es la sabana y hay una fuerte alternancia entre la estación húmeda y seca, siendo en los meses de noviembre a abril cuando tiene lugar la época de lluvias y en los meses de mayo a octubre la estación seca. Los datos bibliográficos acerca de las geohelmintiasis en este país son especialmente escasos, pero destacan cinco estudios: uno realizado por Oliveira *et al.* en el año 2015 en una escuela de la ciudad de Lubango (provincia de Huila, al sur de la provincia de Benguela), en el que detectan

mediante microscopía un 22% de casos de *A. lumbricoides* (Oliveira *et al.*, 2015), otro llevado a cabo por Gasparinho *et al.* en el año 2016 en los menores de 5 años que acudían con diarrea al Hospital General de Bengo, al norte de Benguela y cerca de la capital del país, en el que describen también por microscopía unos datos de prevalencias muy inferiores para *A. lumbricoides* (4,1%) y detectando *S. stercoralis* en el 3,5% de los niños estudiados y *T. trichiura* en el 0,3% (Gasparinho *et al.*, 2016). Recientemente se han publicado datos de la presencia de geohelmintiasis en la misma población objeto de nuestro trabajo, donde se obtienen unas prevalencias por técnicas parasitológicas (técnica de Ritchie y método de Baermann) de 6,1% para uncinarias, de 1,7% para *A. lumbricoides* y del 12,8% para *S. stercoralis* (de Alegria *et al.*, 2017). No obstante, este porcentaje se elevó hasta el 21,4% para *S. stercoralis* mediante la aplicación de técnicas moleculares (Dacal *et al.*, 2018).

En los países fronterizos, República Democrática del Congo, Zambia y Namibia, los datos obtenidos de prevalencia son diferentes. En República Democrática del Congo la infección más prevalente es la uncinariasis con una prevalencia del 52,9%, seguida de ascariasis con un 9,3% y tricuriasis con un 2,1% (Inocencio da *et al.*, 2017), observándose la misma tendencia en Namibia (Sousa-Figueiredo *et al.*, 2015), mientras que en Zambia la mayoría de las infecciones son debidas a la presencia de *A. lumbricoides* (Siwila *et al.*, 2010) (Mwale y Siziya, 2015).

Mozambique, otro país africano centro de nuestro estudio, ocupa uno de los últimos puestos del Índice de Desarrollo Humano del 2018 (180 de 189). Este país de clima tropical, cuenta con dos estaciones, la húmeda desde el mes de octubre a abril y la estación seca desde mayo a septiembre. Además de ser uno de los países prioritarios en la agenda de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo, existen importantes relaciones diplomáticas y económicas con nuestro país. Prueba de ello es la creación del Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM), ubicado en la provincia de Maputo y creado en 1996 a través de un Programa de Cooperación Bilateral entre los Gobiernos de Mozambique y España con el apoyo del Hospital Clínic de la Universitat de Barcelona (a través de la Fundación Clínic per la Recerca Biomédica). En Mozambique no existen numerosos estudios acerca de la distribución y presencia de las geohelmintiasis pero los que hay aportan una gran información. En el año 2007, Mandomando *et al.* publicaron un artículo sobre la etiología de la diarrea mediante técnicas parasitológicas convencionales en menores de 5 años en el hospital del distrito de Manhiça y encontraron que un 9,4% de los casos era debida a *A. lumbricoides*, 1,1% a *S. stercoralis*, 0,4% a *T. trichiura* y 0,2% a uncinarias (Mandomando *et al.*, 2007). En el estudio del 2009 realizado por Augusto *et al.* se analizaron, por las técnicas de Ritchie y Willis,

muestras fecales de población infantil de los 140 distritos de las 10 provincias de Mozambique y observaron que la especie más prevalente dentro de los geohelminthos presentes en la población fue *A. lumbricoides* (65,8%) seguida de *T. trichiura* (54%) y de uncinarias (38,7%), no incluyéndose técnicas para la detección de *Strongyloides* spp. En dicho estudio, las prevalencias globales por provincias fueron más altas en las ubicadas en el norte del país: Nampula (62%), Cabo Delgado (59,9%) y Niassa (51,4%) y más bajas en la de la zona sur: Sofala (34,4%), Inhambane (36,1%) y en Maputo (37,1%). A nivel de distritos, las mayores prevalencias de geohelmintiasis se observaron en el distrito de Quelimane (81,2%), en la provincia de Zambezia; en el distrito de Mecufi (79,7%), en la provincia de Cabo Delgado; en el distrito de Nipepe (78,8%), en la provincia de Niassa y en el distrito de Erati (78,4%), en la provincia de Nampula. Por otro lado, las prevalencias más bajas se notificaron en Lichinga (12,3%), en la provincia de Niassa; en Maxixe (14%), en la provincia de Inhambane y en el distrito de Dondo (14,1%), en la provincia de Sofala (Augusto *et al.*, 2009). En el año 2017, se llevó a cabo un estudio en población general de la región de Beira donde se encontraron unas altas tasas de prevalencia de geohelmintiasis al aplicar técnicas moleculares: 93% para *T. trichiura*, 56% para *A. lumbricoides*, 48% para *S. stercoralis* y 38% para uncinarias, permitiendo además el diagnóstico diferencial de *Ancylostoma* spp. (25%) y de *N. americanus* (15%). Es de destacar que se encontraron infecciones mixtas por las dos especies de uncinarias en un 5% de los individuos y que en total un 96% de la población estudiada (292/303) estaba parasitada por al menos un helminto y el 49% (147/303) por tres o más (Meurs *et al.*, 2017).

De sus países fronterizos se cuenta con pocos estudios. En el sudeste de Tanzania, en la región de Mbeya, se han descrito prevalencias del 26,6% para *T. trichiura* en población adulta (Manz *et al.*, 2017) y los datos que constan de Zimbabue, aunque escasos, son similares con unas prevalencias en torno al 20% para cada geohelminto (Midzi *et al.*, 2014). En Malawi los datos apuntan a prevalencias muy inferiores (Bowie *et al.*, 2004), sin embargo en Sudáfrica, en las poblaciones marginales se han descrito prevalencias por encima del 40% y en Suazilandia no existen datos (Muller *et al.*, 2016).

Al revisar la bibliografía se observa que los artículos publicados en el resto de países de África también proporcionan datos muy dispares. En Uganda, en un estudio reciente se ha descrito una prevalencia global de geohelmintiasis en niños menores de 5 años del 26,5%, siendo la infección más frecuente la uncinariasis (18,5%), seguido de ascariasis (9,8%) y de tricuriasis (0,5%) (Ojja *et al.*, 2018). En ese mismo año en Ghana se encontraron datos similares donde la prevalencia global de helmintos intestinales en población general fue del 19,3%, y concretamente del 12,1% para uncinarias, del 1,5% para *A. lumbricoides* y menor del 1% para

T. trichiura y *S. stercoralis*. Además, la aparición de multi-infecciones se describió en un 1% de la población estudiada (Adu-Gyasi, 2018). En Nigeria, Karshima *et al.* (2018) en un meta-análisis de los datos publicados entre 1980 y 2015 sobre la prevalencia y distribución de geohelminthos en menores de 17 años obtuvieron una prevalencia global del 54,8%, siendo *A. lumbricoides* la especie más prevalente (44,6%), mientras que para *T. trichiura*, uncinarias y *S. stercoralis* las prevalencias fueron de 31,9%, 23% y 3,4%, respectivamente (Karshima, 2018). Por último, en un estudio realizado en 2018 las tasas de parasitación de geohelminthos en población general se encontraron dentro de los rangos descritos en el metanálisis anterior (Babamale *et al.*, 2018). En ese mismo año, en Benin, se llevó a cabo la evaluación de la presencia de geohelminthos en menores de 14 años y obtuvieron la mayor prevalencia para las uncinarias (17,4%), seguido de *A. lumbricoides* (5,4%) y de *T. trichiura* (1,2%) (Ibikounle *et al.*, 2018).

Con respecto al continente americano, en términos de superficie es el segundo más extenso después de Asia. Dentro del mismo, el mayor porcentaje de geohelminthiasis se concentra en América Central, América del Sur y el Caribe, donde cerca de 50 millones de niños en edad preescolar y escolar están en riesgo de padecer estas infecciones. No obstante, en Estados Unidos, aunque la información actual de geohelminthiasis no es suficiente para determinar si son endémicas, en décadas pasadas las uncinarias fueron un grave problema, principalmente en el sur del país, pero gracias a las medidas de control llevadas a cabo por la Fundación Rockefeller se logró reducir la prevalencia de un 41,7% en 1914 al 19,3% en 1930 (Farmer, 1986). A comienzos del siglo XX, motivados por este éxito, se trasladaron los programas de control a América Latina, sin embargo, debido principalmente al bajo nivel socio-económico de estos países, éstos fallaron, traducándose este hecho a día de hoy en el gran riesgo de padecer geohelminthiasis que existe en América Latina (Starr y Montgomery, 2011).

Los artículos publicados en América Latina son numerosos y aunque la gran mayoría son estudios de prevalencia en puntos muy concretos en todos ellos se han descrito casos de geohelminthiasis. En el año 2009, según el estudio *Epidemiological Profiles of Neglected Diseases and Other Infections Related to Poverty in Latin America and the Caribbean* realizado por la Pan American Health Organization (PAHO), solo 8 de los 35 países de esta región habían completado estudios a nivel nacional (Argentina, Belice, Brasil, Haití, Honduras, México, Nicaragua, y Venezuela), obteniéndose prevalencias mayores del 20% en todos los países, exceptuando Venezuela y México donde se obtuvieron valores más bajos. En el resto de países se han realizado estudios de prevalencia en poblaciones o áreas geográficas concretas

encontrándose, en la mayoría de los casos, tasas de parasitación muy por encima del 40%, especialmente en Bolivia y Perú. Estos valores tan altos pusieron de manifiesto la necesidad de implementar urgentemente medidas de control, principalmente la administración masiva de fármacos utilizando como tratamiento de elección el albendazol (Schneider *et al.*, 2011). Los últimos estudios publicados apuntan a que estas intervenciones han sido efectivas, reduciéndose los valores a prevalencias menores del 20% (Segui *et al.*, 2018) (Periago *et al.*, 2018). En cuanto a la estrongiloidiasis, existe una gran heterogeneidad de los resultados publicados debido principalmente a las diferentes técnicas de diagnóstico empleadas, pero en áreas de Argentina, Ecuador, Venezuela, Perú y Brasil se han encontrado prevalencias superiores al 20% (Buonfrate *et al.*, 2015).

Los datos en el Caribe son escasos, procediendo los principales casos publicados de Cuba y Haití. Los estudios más recientes apuntan a que las prevalencias reportadas están subestimadas, especialmente en el caso de la estrongiloidiasis (Saboya *et al.*, 2013) (Ketzi *et al.*, 2017).

Por otro lado, en términos de ocupación del territorio, Europa, es el tercer continente más poblado del mundo, después de África y Asia, por lo que no debe ser olvidado en cuanto al control de las enfermedades parasitarias, especialmente de las geohelminCIAS, ya que aproximadamente 165 millones de personas (más del 20% de la población) viven por debajo del umbral de la pobreza y un 2% en la pobreza absoluta. A pesar de que existen casos puntuales de geohelminCIAS autóctonas en países de Centroeuropa (Galzerano *et al.*, 2010), Hotez y Gurwith en su publicación del año 2011 apuntan a que las NTDs pueden ser muy frecuentes en este continente, especialmente en Europa oriental, meridional y en Turquía. Las condiciones socio-económicas de estos países, así como la inestabilidad de la zona, acuciada principalmente por diferentes conflictos como la caída del comunismo, la ruptura de la antigua Unión Soviética y la guerra de los Balcanes, han llevado a una pérdida de las medidas de control y a niveles de vida más bajos con economías inestables y débiles (Hotez y Gurwith, 2011). De hecho, se han constatado prevalencias de *A. lumbricoides* y otras infecciones producidas por helmintos desde el 1% en Albania al 69% en Turquía. Más concretamente en Albania en población infantil hay datos de prevalencias de 5,6%, 1,9% y 0,6% para uncinarias, *A. lumbricoides* y *T. trichiura*, respectivamente (Sejdini *et al.*, 2011). Sin embargo, también tenemos el ejemplo contrario, como en Austria, donde la presencia de *A. lumbricoides* ha disminuido desde un 26% en 1945 al 0,2% en la década de 1990-2000, principalmente debido a la utilización de fertilizantes químicos que han suplantado el uso agrícola de las heces. En otros países del Norte de Europa, como en Estonia se han publicado datos de seroprevalencia para

A. lumbricoides del 12,7% en población general, duplicándose en población infantil (29,4%) ([Lassen et al., 2016](#)). En Eslovaquia, en el año 2017 se publicó un estudio de los helmintos más frecuentes en niños procedentes de dos regiones (Košice y Prešov) y *A. lumbricoides* fue el parásito con mayor frecuencia de aparición con un 14,3% seguido de *T. trichiura* (3,76%) ([Pipikova et al., 2017](#)). Hay que reseñar que en el año 2018 en una revisión sistemática realizada por Serrano-Moliner *et al.* en la que analizaban el número de casos en la Unión Europea de nematodiasis transmitidas por alimentos contaminados, entre los años 2000-2016, se describió una prevalencia global de *A. lumbricoides* del 27,1% ([Serrano-Moliner et al., 2018](#)).

A pesar de que los datos de estrongiloidiasis en Europa son limitados, también se han notificado casos a lo largo de la historia en la zona del Este de Europa, principalmente en Eslovaquia, Polonia, República Checa y Ucrania ([Zukiewicz et al., 2011](#)) ([Strkolcova et al., 2017](#)). Recientemente se ha descrito una seroprevalencia del 4% en individuos inmunodeprimidos de Turquía ([Kaya et al., 2019](#)), pero los últimos datos publicados apuntan a que actualmente este parásito se encuentra frecuentemente en regiones más cálidas como Portugal, Francia, Italia y España ([MagnaVal et al., 2000](#)) ([Alcaraz et al., 2004](#)) ([Esteban et al., 2016](#)). De hecho, la estrongiloidiasis ha sido considerada como endémica en zonas de la costa mediterránea española, principalmente en la Comunidad Autónoma de Valencia y aunque la prevalencia estimada es baja y relacionada principalmente con actividades agrícolas, en la actualidad no existe transmisión activa debido principalmente a la mecanización en los cultivos ([Cremades Romero et al., 1997](#)) ([Sanchez et al., 2001](#)) ([Martinez-Perez y Lopez-Velez, 2015](#)). Recientemente en la revisión de todos los casos de estrongiloidiasis en España realizada por Barroso *et al.* (2019) se confirman los datos expuestos previamente, y aunque el 97% de los casos de estrongiloidiasis han tenido lugar en Valencia, también se han declarado 13 casos en Alicante y 5 en Murcia. El mayor número de casos en el país tuvo lugar en el año 2011 con 82 pacientes, aunque a partir de ahí se ha reducido considerablemente a una media de 10 casos/año. Además, la gran mayoría de los casos se concentran en hombres (82,9%) con una media de edad de 70 años y con historia de actividad agrícola ([Barroso et al., 2019](#)).

Al igual que en Europa, en Oceanía no se han publicado un gran número de infecciones por helmintos. Según datos hospitalarios recogidos en Australia entre 2002 y 2012, la prevalencia general de uncinarias y *T. trichiura* en el norte del país es bastante baja, con un 0,2% y un 0,7%, respectivamente ([Davies et al., 2013](#)) ([Crowe et al., 2014](#)). En 1918 en el Norte de Queensland, las uncinarias se consideraban un problema grave de salud por lo que se instauró una campaña de control de cinco años de duración para erradicar la enfermedad y, aunque se consideró exitosa, la enfermedad sigue siendo un problema en las comunidades

aborígenes (Prociv y Luke, 1995) (Bradbury *et al.*, 2017). La infección por *Ascaris* spp. nunca ha sido muy frecuente, a diferencia de la producida por *S. stercoralis* que es endémico en regiones tropicales, incluyendo Queensland, el Territorio del Norte, Australia Occidental y Nueva Gales del Sur, estimándose una prevalencia mayor del 60% en aborígenes que viven en comunidades remotas (Jones, 1980) (Prociv y Luke, 1993) (Johnston *et al.*, 2005) (Speare *et al.*, 2015) (Page y Speare, 2016).

1.2.2. Las geohelmintiasis importadas.

A pesar de que el mayor número de casos de geohelmintiasis en el mundo se reportan en zona endémica, cada vez más se recoge la presencia de estas enfermedades en países no endémicos, especialmente en Norteamérica y Europa, relacionados principalmente con la inmigración. Este hecho ha llevado a plantear la necesidad de realizar un cribado sistemático de enfermedades parasitarias principalmente en esta población (Requena-Mendez *et al.*, 2013) (Belhassen-Garcia *et al.*, 2017b) (Agbata *et al.*, 2018) pero también en otras como viajeros que regresan de países de alta endemicidad (Angheben *et al.*, 2011), adopciones internacionales (Buonfrate *et al.*, 2016) (Soriano-Arandes *et al.*, 2016) y pacientes que van a ser sometidos a un trasplante, especialmente para la detección de *S. stercoralis* (Galiano *et al.*, 2016) (Salvador *et al.*, 2017) (Gomez-Junyent *et al.*, 2018).

En Estados Unidos, destacan los estudios que evalúan la prevalencia de helmintos y protozoos en refugiados, encontrando generalmente tasas por debajo del 5% (Garg *et al.*, 2005) (Varkey *et al.*, 2007). Sin embargo, en Europa, destacan más los estudios relacionados con inmigrantes. Hay que reseñar un estudio realizado en la ciudad de Roma en el año 2012 por Manganelli *et al.* que tenía como objetivo evaluar la presencia de parásitos en población infantil inmigrante menor de 15 años, encontrando que el 15% fue positiva para alguna parasitosis, correspondiendo un 0,4% a *A. lumbricoides* y otro 0,4% a *S. stercoralis*. En referencia a su origen, las uncinarias y *A. lumbricoides* estaban más presentes en los inmigrantes procedentes de Asia Central y del Sur, mientras que *S. stercoralis* predominaba en los de origen africano (Manganelli *et al.*, 2012). Recientemente se ha publicado un metanálisis comparando la prevalencia de estrongiloidiasis y esquistosomiasis en inmigrantes que viven en países de baja endemicidad (EEUU, Canadá, Australia, Nueva Zelanda, Israel, y 23 países europeos) y reveló que la seroprevalencia para *S. stercoralis* fue del 12,2%, mientras que por métodos parasitológicos la prevalencia disminuye al 1,8% concentrándose el mayor número de casos serológicamente positivos entre los inmigrantes procedentes del Este de Asia y el Pacífico (17,3%), seguido de los de África subsahariana (14,6%) y Latinoamérica y el Caribe (11,4%) (Asundi *et al.*, 2019).

En España, debido al gran flujo de inmigración de estos últimos años, un 11,8% de la población total española son inmigrantes, principalmente procedentes de Rumanía, Marruecos, Reino Unido, Italia y China y más del 50% de la población extranjera reside en 4 provincias: Madrid, Barcelona, Alicante y Valencia, de acuerdo a los datos publicados por el Registro Central de Extranjeros en junio de 2019 ([RCE, 2019](#)). Un gran número de trabajos recogidos en distintos artículos científicos muestran el panorama de las geohelmintiasis importadas en nuestro país. Así, en el año 2006, Martín Sánchez *et al.* publicaron un artículo sobre parasitosis intestinales en población inmigrante asintomática de origen subsahariano residente en Gran Canaria y observaron que las parasitosis más frecuentes fueron las geohelmintiasis (87,9%), siendo entre ellas las uncinarias las más prevalentes (44,8%) ([Martín Sánchez et al., 2004](#)). Posteriormente, en el año 2010 se recogían las características clínicas y epidemiológicas de 33 casos de estrongiloidiasis importada en España, destacando la necesidad de sospechar de la presencia de una estrongiloidiasis en pacientes inmigrantes o viajeros provenientes de zona endémica con eosinofilia o sintomatología compatible ([Gonzalez et al., 2010](#)). En el año 2013 Salvador *et al.* publicaron un trabajo sobre enfermedades tropicales en pacientes inmigrantes con VIH procedentes de América latina, África subsahariana y norte de África que habían acudido al Hospital Vall d' Hebrón (Barcelona) en el período de 2010 a 2011. En este estudio se aplicaron técnicas parasitológicas, notificándose 2 casos de estrongiloidiasis, 2 de tricuriasis y 1 de ascariasis de un total de 190 pacientes y tras un cribado serológico para estrongiloidiasis, se obtuvo una seroprevalencia global del 18,4% para esta parasitosis ([Salvador et al., 2013](#)). Posteriormente, en 2014 se realizó un estudio retrospectivo de 178 casos de estrongiloidiasis de pacientes del Hospital Carlos III de Madrid y se observó que no existían diferencias significativas entre las características clínicas de pacientes inmigrantes y viajeros, pero que era necesario sospechar de la presencia de *Strongyloides* spp. en pacientes con una elevada IgE y/o eosinofilia ([Ramírez-Olivencia et al., 2014](#)). En ese mismo año se llevó a cabo un estudio realizado por la Unidad de Medicina Tropical del Hospital de Poniente (Almería) sobre las enfermedades infecciosas en población inmigrante procedente de África subsahariana (principalmente Senegal, Malí, Guinea Bissau y Marruecos), América latina, Magreb y el este de Europa, en el que el mayor número de casos de geohelmintiasis apareció en los pacientes procedentes de África subsahariana, siendo el geohelminto más prevalente *S. stercoralis* (un 73,9% de la población analizada mostró serología positiva y el 22,4% larvas en heces), seguido de las uncinarias. En los pacientes procedentes de América latina se detectaron casos de ascariasis, tricuriasis y estrongiloidiasis, siendo esta última la más común de las tres; en pacientes del Magreb se reportaron casos de uncinarias y estrongiloidiasis y en los individuos procedentes del este de Europa únicamente de ascariasis ([Cobo et al., 2016](#)). Más tarde, en el

año 2015, se publicó un estudio serológico para estrongiloidiasis en el Hospital Ramón y Cajal (Madrid) a partir de datos de un cribado realizado entre el año 2000 y 2009 en población inmigrante asintomática procedente de Latinoamérica (Bolivia, Ecuador y Colombia) y África subsahariana (Senegal, Nigeria y Camerún), y en aquellos pacientes que presentaban eosinofilia no filiada se obtuvo una seroprevalencia global del 56,1%, sin encontrar diferencias significativas entre continentes ([Monge-Maillo et al., 2015](#)). Más recientemente, en el año 2018, en el Hospital de Almería, [Salas-Corona et al. \(2018\)](#) reportaron, a partir del cribado de diferentes enfermedades a pacientes subsaharianos, la presencia de uncinarias en un 14,3%, de *T. trichiura* en un 4,1%, de *A. lumbricoides* en un 3,1% y de *S. stercoralis* en un 17,2% ([Salas-Corona et al., 2018](#)). Recientemente se han publicado otros estudios retrospectivos ([Belhassen-Garcia et al., 2017a](#)) ([Martinez-Perez et al., 2018](#)) ([Puerta-Alcalde et al., 2018](#)) ([Monge-Maillo et al., 2018](#)) sobre estrongiloidiasis en España, destacando el de [Belhassen-Garcia et al. \(2017a\)](#) ya que comprende un amplio período de tiempo (1998-2014) e incluye información de diferentes hospitales del Sistema Nacional de Salud. En este estudio se recogieron 507 casos de estrongiloidiasis principalmente localizados en La Rioja, Madrid y Murcia. La aparición en España de casos importados de uncinarias también ha sido recogida en diferentes artículos, bien por la aparición de casos clínicos aislados ([Garcia-Parra et al., 2015](#)) o en estudios de población inmigrante ([Roca et al., 2003](#)) ([Iborra et al., 2009](#)) ([Cuenca-Gomez et al., 2013](#)).

A pesar de que la gran mayoría de los casos importados de geohelmintiasis son puntuales y están concentrados en poblaciones consideradas de riesgo, es importante subrayar el papel del cambio climático y la globalización como precursores de la posibilidad de dispersión de estas enfermedades ([Weaver et al., 2010](#)).

1.3. Diagnóstico de las geohelmintiasis.

1.3.1. Diagnóstico clínico.

El diagnóstico clínico, basado en la historia clínica y en las exploraciones físicas, es particularmente complicado en estas infecciones debido a la inespecífica y en algunos casos ausente sintomatología. Es imprescindible conocer la distribución geográfica de las especies causantes, así como los datos clínicos ya que por regla general los viajeros infectados que regresan de áreas endémicas cursan con cuadros agudos, mientras que los inmigrantes tienden hacia la cronicidad ([Jourdan et al., 2018](#)). En este contexto, es primordial disponer de técnicas de diagnóstico sensibles y específicas que permitan abordar la amplia variedad de situaciones, debido a la diferente naturaleza de los pacientes.

1.3.2. Diagnóstico parasitológico.

Las técnicas parasitológicas consisten en la detección de los huevos presentes en las heces en el caso de *A. lumbricoides*, *A. duodenale*, *N. americanus* y *T. trichiura* y de las larvas en el caso de *S. stercoralis*, ya que éste generalmente no elimina huevos a través de las heces. En ocasiones, también se pueden detectar larvas de uncinarias en las muestras fecales ya que los huevos son muy lábiles y tienden a eclosionar de forma rápida. Esta detección se puede realizar mediante microscopía directa, realizando una preparación con solución salina o aplicando colorantes como el lugol, o bien mediante un método de concentración, previo a la visualización. Los métodos de concentración se fundamentan principalmente en dos procesos: la flotación y la sedimentación.

En la flotación, las heces son suspendidas en una solución de alta densidad favoreciendo que las formas parasitarias menos densas floten, proceso conocido como flotación simple o de Bass. Las principales técnicas empleadas son: técnica de Faust utilizando sulfato de zinc; técnica de Quinn con sulfato de magnesio; técnica de Bailingier con éter y sulfato de zinc, o técnica de Willis con cloruro de sodio saturado. Sin embargo, hay que tener en cuenta que estas técnicas no son útiles en la detección de huevos infértiles de *Ascaris* spp. ni de larvas, ya que por su constitución no flotan ([Cheesbrough, 2009](#)). Una importante variación de las técnicas de flotación, que incluye la cuantificación de las formas parasitarias, es la técnica de Kato Katz, descrita en 1954 por Kato y Miura y modificada por Katz en 1972, considerada como el método de referencia para la identificación y cuantificación de huevos de helmintos por la OMS ([WHO, 2002](#)). Es una técnica fácil, rápida y de bajo coste. Exige que las preparaciones se examinen en un corto período de tiempo (40-60 minutos como máximo, siendo lo idóneo en los primeros 30 minutos), ya que los huevos de uncinarias tienden a eclosionar y liberar las larvas rhabditiformes. La cuantificación de los huevos se calcula en relación a un gramo de material fecal y es una medida estándar de la intensidad de la infección. Así, la OMS clasifica la intensidad de la infección en leve, moderada y alta según el número de huevos por gramo de heces, tal y como aparece reflejado en la **Tabla 1** ([WHO, 2002](#)).

Intensidad	Nº de huevos/g de heces		
	<i>A. lumbricoides</i>	<i>T. trichiura</i>	Uncinarias
Leve	1-4.999	1-999	1-1.999
Moderada	5000-49.999	1.000-9.999	2.000-3.999
Alta	>50.000	>10.000	>4.000

Tabla 1. Grado de intensidad de la infección por *A. lumbricoides*, *T. trichiura* y uncinarias en función del número de huevos por gramo de heces (WHO, 2002).

Otra técnica que nos permite la cuantificación de la carga parasitaria es la técnica de Mc Master, que utiliza una cámara especial de conteo. Las técnicas FLOTAC® (Cringoli, 2006) y Mini-FLOTAC® (Barda *et al.*, 2013), de reciente desarrollo, son también técnicas basadas en la flotación utilizadas para el conteo de huevos de helmintos. Aunque su coste es algo mayor presentan mejor sensibilidad que las descritas anteriormente (Knopp *et al.*, 2009), permitiendo además analizar muestras fecales fijadas (Barda *et al.*, 2015). La técnica Mini-FLOTAC® se desarrolló como un método más simplificada frente al FLOTAC® que fuera aplicable a entornos con instalaciones limitadas (Barda *et al.*, 2013).

Al comparar las técnicas de Kato Katz y Mc Master en el estudio realizado por Levecke *et al.* (2011), en población infantil de Camerún, Tanzania, India, Vietnam y Brasil, se detectaron de manera altamente significativa más casos de *A. lumbricoides* por la técnica de Kato Katz (88,1%) que por Mc Master (75,6%). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la detección de huevos de uncinarias y de *T. trichiura* (Levecke *et al.*, 2011). En el año 2013 se realizó otro trabajo de campo en población infantil de la India y Tanzania, utilizando las técnicas de visualización directa, concentración de formol-éter y Mini-FLOTAC®, siendo este último el método más sensible para la detección de las helmintiasis (90% Mini-FLOTAC®, 60% formol-éter y 30% visualización directa) (Barda *et al.*, 2013). En una revisión sistemática llevada a cabo por Nikolay *et al.* (2014), en la que se compararon de forma conjunta las técnicas de observación microscópica directa, Kato Katz, método de Ritchie, Mc Master, FLOTAC®, y Mini-FLOTAC®, se concluyó que la sensibilidad obtenida para el método FLOTAC® fue superior al resto, con unos porcentajes de 79,7% para *A. lumbricoides*; 91,0% para *T. trichiura* y del 92,4% para uncinarias, y presentando unos valores de 81,8% y 97,1% en bajas y altas infecciones por *A. lumbricoides*, respectivamente. Además, observaron que la técnica que presentó una menor sensibilidad fue la detección microscópica directa con un 52,1% para *A. lumbricoides*, un 62,8% para *T. trichiura* y un 42,8% para uncinarias. En cuanto a los resultados obtenidos con la técnica de Kato Katz, empleada por duplicado para cada muestra, se obtuvieron unas sensibilidades del 74-95% para infecciones de alta intensidad disminuyendo hasta un 53-80% en infecciones con baja carga parasitaria, sensibilidad similar a la obtenida por la técnica de

Mini-FLOTAC® ([Nikolay et al., 2014](#)). Más aún, en un estudio realizado en Tanzania se describe una mayor sensibilidad del Mini FLOTAC® frente al Kato Katz, sumando a esto las ventajas logísticas que ofrece el método ya que el Mini-FLOTAC® no necesita centrifugación como el método FLOTAC® y sólo se requiere de 10-12 minutos para la preparación de la muestra previo al análisis microscópico ([Knopp et al., 2014](#)).

En las técnicas de sedimentación, basadas en la acción de la gravedad, ocurre lo contrario. Las heces son suspendidas en una solución de baja densidad permitiendo que pasado un tiempo las formas parasitarias se asienten en el fondo del tubo, proceso conocido como sedimentación espontánea o de Hoffman-Pons-Janer, que se puede acelerar añadiendo un paso de centrifugación. Una de las técnicas más utilizadas para la visualización de los huevos son las de concentración difásica, desarrolladas inicialmente por Carles y Barthelemy en 1917, utilizando éter y ácido cítrico y modificadas posteriormente utilizando formol y éter (método de Ritchie) o formol y acetato de etilo (método de Ritchie modificado). La peculiaridad de esta técnica es la aplicación de compuestos específicos para la eliminación de grasas y fijación de las muestras. Otra técnica alternativa es la de Telemann, que tiene el mismo fundamento que la técnica de Ritchie, utilizando éter y ácido clorhídrico. En cuanto a la detección de larvas de *S. stercoralis* la sensibilidad de estas técnicas es baja, del 30% por microscopía directa o del 40-50% mediante el método de Ritchie ([Siddiqui y Berk, 2001](#)) ([Campo et al., 2014](#)) dado que su expulsión es de forma intermitente y generalmente la carga parasitaria es baja, por lo que es necesario realizar el análisis de muestras seriadas ([Siddiqui y Berk, 2001](#)) ([Montes, 2010](#)) o aplicar otras técnicas más específicas, como la técnica de Baermann o el método de Harada Mori, basados en el tropismo de las larvas por el agua ([Ines et al., 2011](#)), ofreciendo así una sensibilidad mayor, en torno al 70% ([Campo et al., 2014](#)). Por otro lado, el cultivo en placas de agar con o sin carbón nos permite ver el rastro que deja la larva al desplazarse por la superficie, ofreciendo una alternativa diagnóstica de mayor sensibilidad, cercana al 90% ([Shore Garcia, 2007](#)). En la literatura está ampliamente descrito que la técnica de Baermann aumenta aproximadamente 4 veces la probabilidad de detectar la infección en comparación con el método de Ritchie o la visualización directa y, aunque esta técnica es altamente sensible y específica, la necesidad de disponer de muestras frescas ha limitado enormemente su uso. Esta misma problemática aparece con la técnica de cultivo en agar y, a pesar de presentar una sensibilidad cercana al 90%, su uso se encuentra restringido ya que se requiere como mínimo entre 2 a 3 días para obtener resultados ([Assefa, 1991](#)) ([de Kaminsky, 1993](#)). Además, en contextos de bajos recursos la probabilidad de contaminación bacteriana y fúngica es muy elevada. Por ello, se han realizado mejoras dirigidas a prevenir la

contaminación bacteriana en el agar sin modificar su sensibilidad ([Pocaterra et al., 2017](#)). Recientemente, se ha realizado un estudio con muestras procedentes de Colombia en el que se comparaba la eficacia de diferentes técnicas de diagnóstico directo para la detección de *Strongyloides* spp., en las que se incluían, además de la PCR en tiempo real como técnica molecular, el método de Ritchie, el cultivo en agar y la técnica de Harada Mori. Dejando de lado los resultados obtenidos por PCR, de entre las técnicas parasitológicas convencionales, la que proporcionó mejores resultados fue el método de Ritchie ([Campo-Polanco et al., 2018](#)). Sin embargo, en otros estudios, se han descrito mejores valores de sensibilidad para la técnica de Harada Mori que para el método de Ritchie, pero menores que los obtenidos por la técnica de Baermann o cultivo en agar ([Arakaki, 1990](#)).

Las técnicas descritas anteriormente presentan diferentes sensibilidades y especificidades debido a sus diferencias metodológicas, pero también se ven influidas o son dependientes de la intensidad de la infección por estos helmintos que generalmente viene marcada por la población de estudio.

Al evaluar el diagnóstico parasitológico es importante tener en cuenta el número de muestras necesarias a analizar en cada técnica para llegar a un diagnóstico fiable, así como la posibilidad de disponer de muestras de diferente naturaleza, y sobre todo a la hora de su aplicación en trabajos de campo en zona endémica, el tiempo que se emplea en procesar las muestras y el coste asociado a la utilización de unas técnicas u otras.

1.3.3. Diagnóstico inmunológico.

Las técnicas serológicas son métodos que permiten la detección de anticuerpos en el suero del paciente. En general, estas técnicas son sensibles, pero poco específicas. Los resultados obtenidos en la serología van a depender de diferentes factores como el perfil de la población de estudio, la presencia de otras infecciones, el tipo de inmunoglobulina que se analice y el estado inmunológico del paciente. El método más empleado son los ensayos de ELISA (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), diseñados para detectar las inmunoglobulinas G (IgG) frente a distintas fracciones antigénicas de huevos, larvas o adultos, o antígenos recombinantes ([Rodrigues et al., 2007](#)). Sin embargo, la presencia de reacciones cruzadas entre los helmintos es una de las desventajas más importantes que ofrece esta metodología ([Norsyahida et al., 2013](#)), además de la dificultad de obtención de material parasitario como fuente antigénica y a la falta de modelos experimentales adecuados que permitan el mantenimiento de los parásitos en el laboratorio ([Schneider et al., 2015](#)).

Para el caso de ascariasis y tricuriasis no existen prácticamente estudios al respecto y para esta última la única aproximación diagnóstica a nivel serológico está basada en técnicas de inmunoprecipitación con antígenos de Excreción/Secreción (E/S) (Lillywhite *et al.*, 1995) (Leroux *et al.*, 2018). Sin embargo, a día de hoy no se han descrito numerosos avances en este sentido. En referencia a la ascariasis se ha demostrado que los antígenos de E/S liberados por el parásito provocaban una respuesta de anticuerpos mayor que la producida contra los componentes somáticos del mismo, presentando además una mayor especificidad (Chatterjee *et al.*, 1996) (Yoshida *et al.*, 2016). En este sentido, en ensayos de inmunotransferencia de los productos de E/S de *Ascaris suum* frente a sueros de pacientes que sufrían otras helmintiasis se ha obtenido una especificidad del 95% (Schneider *et al.*, 2015). Sin embargo, los datos obtenidos en los ensayos realizados por el método ELISA comercial de NOVALISA™ (NovaTec immunodiagnostica GmbH, Germany) muestran un elevado porcentaje de falsos positivos debido a las reacciones cruzadas con otros helmintos afines (McSharry, 1999). En relación con el diagnóstico inmunológico de las uncinurias, en este caso se centra en pruebas de coproantígenos aunque no se encuentran muy desarrolladas y actualmente sólo han sido publicadas en modelos experimentales con hámster y con la especie *Ancylostoma ceylanicum* (Bungiro y Cappello, 2005) (Corripio *et al.*, 2010). Actualmente no hay evidencias de mejoras en el diagnóstico serológico de estas geohelmintiasis.

No ocurre así en el diagnóstico inmunológico de la estrongiloidiasis donde las técnicas serológicas tienen un papel muy importante, aunque también presentan limitaciones como es la obtención de larvas filariformes de *S. stercoralis* y su producción a gran escala, por lo que es habitual la utilización de fracciones antigénicas heterólogas de *Strongyloides ratti* y *S. venezuelensis*, así como de antígenos recombinantes (VAN Doorn *et al.*, 2007). Para el diagnóstico de esta enfermedad se dispone de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) que aunque presenta elevados valores de sensibilidad (97%) y especificidad (98%) la necesidad de disponer de un gran número de larvas ha supuesto un gran inconveniente en cuanto a su utilización en la rutina diagnóstica de la enfermedad (Koosha *et al.*, 2004) (Boscolo *et al.*, 2007). Para tratar de solventar esta problemática se han desarrollado técnicas de aglutinación como GPAT (del inglés *Gelatin Particle indirect Agglutination test*) o IHAT (del inglés *Indirect Hemagglutination Antibody Test*) pero presentan valores de sensibilidad y especificidad menores, en torno al 81% y 74%, respectivamente (Dreyer *et al.*, 1996) (Sithithaworn *et al.*, 2005).

Actualmente, la técnica más ampliamente utilizada es la técnica ELISA que permite la detección de IgG frente a antígenos somáticos de *S. ratti* y *S. stercoralis*, aunque también se dispone de antígenos recombinantes, como el denominado NIE, una molécula de 31 kDa clonada por Ravi *et al.* (2002) a partir de una genoteca de cDNA de larvas filariformes de *S. stercoralis* (Ravi *et al.*, 2002). En la actualidad se cuenta con diferentes técnicas convencionales para abordar el diagnóstico serológico de la estrongiloidiasis, mayoritariamente en formato ELISA, utilizando diferentes fuentes antigénicas y con distintos niveles de sensibilidad y especificidad descritos en la **Tabla 2**. Más recientemente se han desarrollado técnicas que aportan mejores resultados pero de mayor coste, como es el ensayo LIPS (del inglés *Luciferase Immunoprecipitation Systems*), una técnica de inmunoprecipitación indirecta que utiliza dos antígenos recombinantes (NIE y SsIR). Esta técnica ha resultado ser útil en la monitorización de los pacientes tras el tratamiento además de no presentar reacciones cruzadas y realizarse en un menor tiempo que otros ensayos inmunoenzimáticos (Ramanathan *et al.*, 2008).

La utilización de antígenos recombinantes como el antígeno NIE, SsIR, 5a ó 12 mejora notablemente la especificidad del diagnóstico (Ramanathan *et al.*, 2008) pero los datos de sensibilidad obtenidos no han sido tan buenos como lo esperado, únicamente son mejores en formato LIPS pero esto conllevaría un encarecimiento del diagnóstico.

Nombre del Kit	Fabricante	Fuente antigénica	Formato	Sensibilidad/Especificidad/Referencia
Bordier <i>Strongyloides ratti</i> ELISA	Bordier Affinity Products, Crissier, Suiza	<i>S. ratti</i> (antígenos somáticos)	ELISA	88%/94%/Instrucciones fabricante 83,3%/97,2%/Van Doorn <i>et al.</i> (2007) 90,8%/94,1%/Bisoffi <i>et al.</i> (2014)
SciMedx <i>Strongyloides</i> serology microwell ELISA	SciMedx Corporation, Denville, NJ	<i>S. stercoralis</i>	ELISA	85,5%/82,6%/Anderson <i>et al.</i> (2014) 91,4%/42,1%/Ruantip <i>et al.</i> (2019)
AccuDiag™ <i>Strongyloides</i> IgG ELISA Kit	IVD Research, Inc., Carlsbad, CA	<i>S. stercoralis</i>	ELISA	100%/100%/Instrucciones fabricante
<i>Strongyloides</i> IgG IVD-ELISA kit	DRG Instruments GmbH, Marburg, Germany	<i>S. stercoralis</i>	ELISA	84-92%/83-98%/Instrucciones fabricante 88,9%/97,2%/Van Doorn <i>et al.</i> (2007) 91,2%/93,3%/Bon <i>et al.</i> (2010) 91,9%/97,4%/Bisoffi <i>et al.</i> (2014)
Strongy Detect™ IgG ELISA Kit	InBios, Seattle, EEUU	Antígeno recombinante NIE	ELISA	97%/95%/Ramanathan <i>et al.</i> (2008) 97,8%/100%/Krolewiecki <i>et al.</i> (2010) 70,8%/91,1%/Bisoffi <i>et al.</i> (2014) 83,6%/91,3%/Anderson <i>et al.</i> (2014) 82,9%/57,9%/Ruantip <i>et al.</i> (2019)
NovaLisa <i>Strongyloides</i>	NovaTec Immunodiagnostica GmbH, Germany	Antígeno recombinante NIE	LIPS ELISA	97%/100%/Ramanathan <i>et al.</i> (2008) 97,8%/100%/Krolewiecki <i>et al.</i> (2010) 83,8%/99,6%/Bisoffi <i>et al.</i> (2014) 89,1%/89,1%/Anderson <i>et al.</i> (2014)
<i>Strongyloides</i> -AB ELISA	IBL INTERNATIONAL GMBH, Germany	Antígeno recombinante	ELISA	89,47%/94,12%/Instrucciones fabricante

Tabla 2. Protocolos comerciales de serología para el diagnóstico de la estrongiloidiasis

Con el fin de mejorar la especificidad y sensibilidad algunos autores apuntan hacia la determinación de las diferentes subclases de isotipos de inmunoglobulinas más específicas que las IgG-totales (IgG-T), como se ha aplicado en el diagnóstico de otras helmintiasis ([Fischer et al., 2005](#)).

Ciertos autores sostienen que la IgG1 regula la infección temprana y es más frecuente en individuos sanos, predominando en individuos más jóvenes en lugar de personas de más edad ([Arifin et al., 2018](#)). Sin embargo, esta relación con la edad no fue demostrada en el estudio [Sultana et al. \(2012\)](#), en el que la presencia de IgG1 se incrementaba de forma altamente significativa con la edad de los pacientes ([Sultana et al., 2012](#)), tal y como habían observado previamente otros autores ([Yori et al., 2006](#)) ([Becker et al., 2011](#)). Las inmunoglobulinas IgG2 e IgG-3, debido al tipo de respuesta inmune de los helmintos presentan una menor sensibilidad, proporcionando una menor información ([Conway et al., 1994](#)). Otros autores han considerado que la presencia de IgG4 es marcador de infección activa en enfermedades crónicas y actúa como modulador de la respuesta inmune mediada por Ig-E ([Atkins et al., 1997](#)), ([Satoh et al., 1999](#)), ([Rodrigues et al., 2007](#)), observándose que la detección de IgG4 aumenta en más de un 13,3% la especificidad en comparación con la detección de IgG-T, manteniendo similares niveles de sensibilidad, en el diagnóstico de la estrongiloidiasis ([Norsyahida et al., 2013](#)). Por otro lado también se ha postulado que, según avanza la infección, los niveles de IgG4 descienden y la respuesta por IgG1 cobra más importancia, siendo ésta la que permanece a lo largo de la enfermedad ([Sultana et al., 2012](#)). El papel de cada inmunoglobulina en la respuesta inmune frente a la estrongiloidiasis es un tema que aún está sin resolver. No existen numerosos estudios y los que hay aportan información contradictoria y no muy detallada, porque de base no están bien definidos los estatus crónico o activo y aunque se dispusiera de esta información la dinámica de las inmunoglobulinas es compleja ya que, debido a las características del ciclo biológico del parásito, nos podemos encontrar con sucesivos ciclos de autoinfección con las correspondientes variaciones en la respuesta inmune que esto conllevaría.

Otra técnica complementaria de diagnóstico indirecto es el *Western Blot* (WB) que permite la confirmación de los resultados obtenidos por otras técnicas identificando diferentes proteínas, encontrándose las de mayor interés diagnóstico en la franja entre 20 y 40 kDa, con unos altos niveles de sensibilidad y especificidad. De forma más concreta, en muestras de suero de pacientes con estrongiloidiasis confirmada se han identificado componentes antigénicos dominantes de *S. stercoralis* con un peso molecular de 28, 31 y 41 kDa ([Conway et](#)

al., 1993) (Conway *et al.*, 1994) (Uparanukraw *et al.*, 1999). Posteriormente, en un estudio realizado por Silva *et al.* (2003) utilizando como antígeno una fracción proteica soluble de *S. ratti*, aplicada al análisis de 180 muestras de suero de población procedente de Brasil: 80 pacientes que habían expulsado larvas de *Strongyloides* spp. en heces, 60 pacientes positivos a otras helmintiasis y 40 sueros de donantes sanos, encontraron 11 antígenos inmunodominantes (10, 14, 17, 20, 26, 28-35, 55, 81, 85, 126 y 138 kDa) que fueron reconocidos en el 25% de los pacientes parasitológicamente confirmados. La banda más frecuentemente reconocida fue la de 28-35 kDa, intervalo que corresponde a las bandas de 28 y 31 kDa ya descritas previamente por otros autores (Conway *et al.*, 1993) (Conway *et al.*, 1994) (Uparanukraw *et al.*, 1999), sin embargo, no se encontró reactividad frente a proteínas de 41 kDa, lo que pone de manifiesto las posibles diferencias antigénicas entre las especies *S. stercoralis* y *S. ratti* (Silva *et al.*, 2003). Por otro lado, Sudré *et al.* (2007) que utilizaron para su ensayo un extracto proteico de *S. stercoralis*, identificaron tres bandas reactivas de 33, 26 y 21 kDa como dominantes en pacientes parasitológicamente confirmados, siendo la de 26 kDa la única con posible potencial diagnóstico, ya que las otras dos bandas fueron reconocidas por los sueros de individuos sanos (Sudre *et al.*, 2007). Más recientemente, se han publicado resultados de WB utilizando como antígeno heterólogo un extracto proteico de *S. venezuelensis* identificándose un complejo inmunodominante de 35-40 kDa en el 50% de los pacientes que había expulsado larvas de *S. stercoralis* en heces (Corral *et al.*, 2017). Estos resultados vienen a confirmar los obtenidos por otros autores utilizando también como fuente antigénica un extracto proteico de *S. venezuelensis* (Machado *et al.*, 2008) (Gonzaga *et al.*, 2011). El uso de antígenos recombinantes también se ha extendido a la técnica de WB. Arifin *et al.* (2018) al utilizar como antígeno la proteína purificada RsS1 o rSs1a en la detección de IgG4 en sueros de pacientes con estrongiloidiasis identificaron una banda de 37 kDa como reactiva, posiblemente incluida en el complejo de 35-40 kDa descrito anteriormente (Arifin *et al.*, 2018). Es de destacar que la variabilidad de resultados en cuanto al peso molecular de las proteínas reactivas descritas es posiblemente debida a la gran heterogeneidad de protocolos de WB empleados, al método de obtención de fuente antigénica y su origen.

Las técnicas serológicas también han sido utilizadas como herramienta para evaluar la eficacia del tratamiento en pacientes con estrongiloidiasis. De hecho, se ha observado que tras su administración, se produce una disminución significativa de los niveles de anticuerpos tanto en ensayos con el antígeno recombinante NIE en formato LIPS (NIE-LIPS) y ELISA (NIE-ELISA) como al utilizar kits de ELISA con extractos crudos del parásito (Fradejas *et al.*, 2018). Por otro lado, merece mención el papel de IgG4 como un posible marcador de curación, ya que su

presencia en pacientes tratados podría relacionarse con un fallo terapéutico o resistencia al fármaco utilizado, sin olvidar la posibilidad de reinfección ([Yap, 2013](#)).

Por otro lado, también se disponen de técnicas de coproantígeno en formato ELISA que aparentemente presentan una mejor especificidad disminuyendo las reacciones cruzadas pero aún se necesita realizar estudios más completos ([Sykes y McCarthy, 2011](#)) ([Buonfrate et al., 2015](#)).

1.3.4. Diagnóstico molecular.

El diagnóstico molecular se presenta como una alternativa al diagnóstico parasitológico e inmunológico permitiendo la detección directa del ADN parasitario por diferentes técnicas de amplificación como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional en sus diferentes variantes o en tiempo real, tanto en formato simple como multiplex, frente a diferentes dianas, presentando una elevada especificidad, sensibilidad y reproductibilidad. Es importante tener en cuenta que, aunque cada vez menos, el coste es elevado y se necesita un equipamiento específico adecuado para el desarrollo de este tipo de técnicas, lo que supone un gran inconveniente para su aplicación en trabajos de campo *in situ*. El principal coste aparte del aparataje se deriva de la extracción de los ácidos nucleicos para su amplificación. Este paso de extracción es fundamental y aunque existen diferentes protocolos, desde la extracción orgánica, separación magnética, intercambio aniónico o precipitación por sales, entre otros, los basados en afinidad por columnas de sílice en formato kit son los más utilizados para la extracción de ADN de muestras de heces, caracterizadas por poseer una gran cantidad de inhibidores de la técnica PCR, por lo que escoger un buen método de extracción es una tarea fundamental. La utilización de robots de extracción permiten la simplificación de los protocolos y la combinación de las técnicas de amplificación por PCR con estos nuevos sistemas robotizados para la preparación de las muestras ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares para la identificación y cuantificación de agentes patógenos ([Verweij et al., 2014](#)).

A lo largo de los últimos años se han desarrollado diferentes métodos de PCR con distintas dianas de amplificación, la mayoría de ellas corresponden principalmente a ADN ribosomal, como los segmentos espaciadores transcritos internos (ITS1 y ITS2) o la subunidad 18S, así como al ADN mitocondrial. Frente a los diferentes protocolos de amplificación, la técnica de PCR en tiempo real, además de proporcionar un gran rendimiento tiene la gran ventaja de que no requiere realizar un análisis electroforético para la detección de los productos de amplificación con la disminución en el tiempo de emisión de resultados que ello

conlleva y evitando riesgos de contaminación (Espy, 2006). El sistema de detección en la PCR en tiempo real es fluorimétrico y los fluoróforos empleados pueden ser de dos tipos: fluoróforos con afinidad por el ADN o sondas específicas para fragmentos del ADN. Dentro de los fluoróforos con afinidad, el más utilizado es el *Sybr Green*[®], que se intercala en el surco menor del ADN de doble cadena incrementando su fluorescencia. Este sistema es económico aunque es necesario discriminar las amplificaciones inespecíficas realizando un análisis de la curva de desnaturalización (Lutfalla y Uze, 2006). En cuanto a las sondas (hidrólisis, hibridación, horquilla, etc.) su uso es más frecuente y se basan en el principio de FRET (del inglés *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), donde cada sonda porta un donador y un aceptor (apagador o *quencher*). Si ambos están próximos, el apagador absorbe la fluorescencia del donador, mientras que si están alejados la fluorescencia no puede ser absorbida y su emisión puede ser detectada. Dentro del formato de sondas de hidrólisis las más ampliamente utilizadas, y en especial en la detección de las geohelminCIAS, son las sondas *TaqMan*, que aprovechan la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa durante la amplificación, de manera que el donador y aceptor se separan y se detecta fluorescencia. Tras el desarrollo de la biología molecular se han descrito numerosos protocolos de amplificación de ADN para la detección de geohelminCIAS que aparecen recogidos en la **Tabla 3**.

Referencia	Técnica	Diana	Extracción de ADN	Especie(s)	Múltiplex
Verweij <i>et al.</i> (2007)	RT-PCR (TaqMan)	ITS-2	QIAamp Tissue Kit	<i>A. duodenale</i> , <i>N. americanus</i> , <i>Oesophagostomum bifurcum</i>	✓
Nilforoushani <i>et al.</i> (2007); Ahmad <i>et al.</i> (2013)	PCR convencional (Nested)	ITS-1	Powersoil DNA Isolation Kit	<i>S. stercoralis</i>	✗
Verweij <i>et al.</i> (2009)	RT-PCR (TaqMan)	ARNr 18S, citocromo C oxidasa, secuencia repetida específica	QIAamp Tissue Kit (modificado)	<i>S. stercoralis</i>	✗
Moghaddassani <i>et al.</i> (2011)	PCR convencional	ITS1-5.8S-ITS2	QIAamp DNA stool Mini Kit	<i>S. stercoralis</i>	✗
Janwan <i>et al.</i> (2011)	RT-PCR (SG + melting)	ARNr 18S	QIAamp DNA stool Mini Kit	<i>S. stercoralis</i> , <i>Opisthorchis viverrini</i>	✓
Basuni <i>et al.</i> (2011)	RT-PCR (TaqMan)	ARNr 18S, ITS1, ITS2	QIAamp DNA stool Mini Kit	<i>S. stercoralis</i> , <i>Ancylostoma spp.</i> , <i>N. americanus</i> , <i>A. lumbricoides</i>	✓
Taniuchi <i>et al.</i> (2011)	RT-PCR (TaqMan); Luminex	ARNr 18S, ITS1, ITS2, COWP	QIAamp DNA stool Mini Kit	<i>S. stercoralis</i> , <i>A. duodenale</i> , <i>N. americanus</i> , <i>A. lumbricoides</i> , <i>Cryptosporidium spp.</i> , <i>G. intestinalis</i> , <i>E. histolytica</i>	✓
Ngui <i>et al.</i> (2012); Sharifdini <i>et al.</i> (2017)	PCR convencional	ITS2	DNA Extraction Mini kit	<i>N. americanus</i>	✗
Mejia <i>et al.</i> (2013)	RT-PCR (TaqMan)	ARNr 18S	MP FastDNA for Soil Kit (modificado)	<i>S. stercoralis</i> , <i>A. duodenale</i> , <i>N. americanus</i> , <i>A. lumbricoides</i> , <i>T. trichiura</i> , <i>Cryptosporidium spp.</i> , <i>Giardia lamblia</i> , <i>Entamoeba histolytica</i>	✗

Tabla 3. Protocolos de PCR para el diagnóstico de geohelmintiasis (continuación). ARNr: ARN ribosomal; HRM: Melting de alta resolución; ITS-1: Espaciador transcrito interno 1; ITS-2: Espaciador transcrito interno 2; NGS: Secuenciación de última generación; RT-PCR: PCR en tiempo real; SG: *Sybr Green*.

Referencia	Técnica	Diana	Extracción de ADN	Especie(s)	Múltiplex
Sultana <i>et al.</i> (2013)	RT-PCR (TaqMan)	ARNr 18S	QIAamp Tissue Kit (modificado), Powersoil DNA Isolation Kit, Ultra Clean Fecal DNA Kit, NucliSENS easy MAG	<i>S. stercoralis</i>	✗
Knopp <i>et al.</i> (2014)	RT-PCR (TaqMan)	ITS2	QIAamp Tissue Kit	<i>A. lumbricoides</i> , <i>N. americanus</i> , <i>Schistosoma mansoni</i> , <i>S. stercoralis</i>	✓
Phuphisut <i>et al.</i> (2014)	PCR convencional	COI, ITS1, ARNr 18S	FavorPrep Stool DNA isolation Mini Kit	<i>N. americanus</i> , <i>T. trichiura</i> , <i>A. lumbricoides</i>	✓
Saugar <i>et al.</i> (2015)	RT-PCR (SG + melting)	ARNr 18S	QIAamp DNA stool MiniKit (modificado)	<i>S. stercoralis</i>	✗
Gordon <i>et al.</i> (2015)	RT-PCR (TaqMan)	ITS1-ITS2	QIAamp DNA stool Mini Kit	<i>N. americanus</i> , <i>A. duodenalis</i> , <i>A. lumbricoides</i> , <i>Taenia</i> spp.	✓
Llewellyn <i>et al.</i> (2016)	RT-PCR (TaqMan)	ITS1-ITS2, SSU-ARNr	Powersoil DNA Isolation Kit	<i>N. americanus</i> , <i>Ancylostoma</i> spp., <i>Ascaris</i> spp., <i>S. stercoralis</i> , <i>E. histolytica</i> , <i>G. duodenalis</i> , <i>Cryptosporidium</i> spp., <i>T. trichiura</i>	✓
Repetto <i>et al.</i> (2016)	PCR convencional	ARNr 18S	QIAamp DNA stool Mini Kit (modificado)	<i>S. stercoralis</i>	✗
Pilotte <i>et al.</i> (2016)	RT-PCR (TaqMan)+ NGS	ITS- ARNr 18S	Powersoil DNA Isolation Kit	<i>N. americanus</i> , <i>A. duodenale</i> , <i>T. trichiura</i> , <i>A. lumbricoides</i> , <i>S. stercoralis</i>	✗
Lodh <i>et al.</i> (2016)	PCR convencional	secuencia repetida dispersa	QIAampDNA Blood Mini Kit	<i>S. stercoralis</i>	✗

Tabla 3 (Continuación). Protocolos de PCR para el diagnóstico de geohelmintiasis (continuación). ARNr: ARN ribosomal; HRM: *Melting* de alta resolución; ITS-1: Espaciador transcrito interno 1; ITS-2: Espaciador transcrito interno 2; NGS: Secuenciación de última generación; RT-PCR: PCR en tiempo real; SG: *Sybr Green*.

Referencia	Técnica	Diana	Extracción de ADN	Especie(s)	Múltiplex
George <i>et al.</i> (2016) Chidambaram <i>et al.</i> (2017)	PCR convencional (semi-Nested)	ITS1-5.8S-ITS2	QIAamp DNA stool Mini Kit	<i>N. americanus</i> , <i>A. duodenale</i> , <i>A. ceylanicum</i>	✗
Sahimin <i>et al.</i> (2017)	PCR convencional (semi-Nested)	ITS2, ARNr 28S	NucleoSpin Soil Kit	<i>N. americanus</i> , <i>Ancylostoma</i> spp.	✗
Cunningham <i>et al.</i> (2018)	RT-PCR (HRM)	SSU-ARNr 18S	QIAamp DNA Mini Kit (modificado)	<i>N. americanus</i> , <i>A. duodenale</i> , <i>A. lumbricoides</i> , <i>S. stercoralis</i> , <i>T. trichiura</i> , <i>Schistosoma</i> spp.	✓
Fui Hii <i>et al.</i> (2018)	RT-PCR (TaqMan)	ITS1, ITS2	Fecal Isolate II DNA extraction kit	<i>N. americanus</i> , <i>A. ceylanicum</i> , <i>A. duodenale</i> , <i>Ancylostoma caninum</i>	✓
Gorgani-Firouzjaee <i>et al.</i> (2018)	RT-PCR (TaqMan)	ARNr 18S, citocromo C oxidasa	PCR BIO Rapid extract PCR kit	<i>S. stercoralis</i>	✗
Javanian <i>et al.</i> (2019)	PCR convencional	18S rRNA gene	PCR BIO Rapid extract PCR kit	<i>S. stercoralis</i>	✗
Formenti <i>et al.</i> (2019)	RT-PCR (TaqMan) PCR convencional	secuencia repetida dispersa, ARNr 18S	DNA isolation kit I	<i>S. stercoralis</i>	✗
Watts <i>et al.</i> (2019)	RT-PCR (TaqMan)	ARNr 18S	Powersoil DNA Isolation Kit	<i>S. stercoralis</i>	✗

Tabla 3 (Continuación). Protocolos de PCR para el diagnóstico de geohelmintiasis (continuación). ARNr: ARN ribosomal; HRM: *Melting* de alta resolución; ITS-1: Espaciador transcrito interno 1; ITS-2: Espaciador transcrito interno 2; NGS: Secuenciación de última generación; RT-PCR: PCR en tiempo real; SG: *Sybr Green*.

Recientemente, también se están empleando otros métodos de amplificación como la técnica LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*), especialmente como técnicas *point of care*, en el diagnóstico de parasitosis y en especial de las geohelmintiasis. En los protocolos descritos se obtienen especificidades cercanas al 100% para la detección de *N. americanus*, *A. lumbricoides*, *T. trichiura* y *S. stercoralis*; sin embargo la sensibilidad es variable. Para la detección de *N. americanus* existen dos protocolos a partir del ADN de muestras de heces humanas en los que se describen sensibilidades de 0,4 fg para la detección de huevos (Mugambi *et al.*, 2015) y de 1 pg para adultos, larvas y huevos (Rashwan *et al.*, 2017). En el caso de la detección del ADN de los adultos de *T. trichiura* y *A. lumbricoides* la sensibilidad obtenida es de 1 pg (Rashwan *et al.*, 2017). Sin embargo, esta sensibilidad disminuye a 10,8 ng para la detección de huevos de *A. lumbricoides* a partir de heces humanas (Shiraho *et al.*, 2016). Por último, para la amplificación de *S. stercoralis* destacan dos protocolos: uno a partir de muestras de heces y de orina de ratas infectadas experimentalmente (Fernández-Soto *et al.*, 2016) obteniéndose un resultado positivo a los 6 días post-infección con 40 larvas L3 y a los 5 días con 400 o 4000 larvas L3; y otro a partir de muestras de heces humanas permitiendo detectar el ADN correspondiente a 0,01 larvas (Watts *et al.*, 2014).

Es de destacar la importancia de la utilización de esta técnica como herramienta para la evaluación de los programas de administración masiva de fármacos, donde tras el tratamiento la carga parasitaria decae y la baja sensibilidad de las técnicas parasitológicas no permite detectar las infecciones leves. Por otro lado, la elevada especificidad de estos protocolos es imprescindible en zonas de alta endemicidad donde coexisten diferentes helmintos (Deng *et al.*, 2019).

1.4. Control de las geohelmintiasis.

La forma de abordar el control de las geohelmintiasis es uno de los puntos más importantes y de mayor repercusión dado el número de casos en el mundo, la dificultad de su diagnóstico, la alta tasa de morbilidad que ocasionan y su presencia en las zonas más deprimidas del mundo.

En los programas de control de las geohelmintiasis se incluyen a los cuatro geohelmintos causantes de enfermedad en el ser humano y que en su ciclo de vida tienen un paso obligatorio por el suelo: *Ascaris* spp., *Ancylostoma* spp., *Necator* spp., y *Trichuris* spp., excluyéndose así al género *Strongyloides* spp., en el que este paso no es siempre obligado por la posibilidad de un ciclo de autoinfección en el interior del hospedador, sin necesidad de una fuente exógena para su transmisión.

A pesar de que *S. stercoralis* está excluido de este grupo, todos ellos presentan características comunes: tienen estadios parasitarios de huevo, larva y adulto, ninguno de ellos necesita de un hospedador intermediario para su ciclo biológico y afectan al sistema gastrointestinal (Hall *et al.*, 2008), pero también presentan diferencias particulares que son fundamentales como la vía de transmisión, la efectividad del tratamiento y los grupos sociales a los que afectan mayoritariamente. Las similitudes entre todos estos parásitos cuestionan la exclusión de *S. stercoralis* en este grupo, haciendo un llamamiento a su inclusión para que la estrongiloidiasis deje de ser “la olvidada entre las olvidadas” (Krolewiecki *et al.*, 2013) (Bisoffi *et al.*, 2013). Hay que destacar que su presencia se ve influida por determinados factores ecológicos y sociales, como son los hábitos y condiciones de vida, caracterizados especialmente por una falta de saneamiento, por lo que cabe esperar que la forma de presentación más común sea la coinfección, destacando la biparasitosis como la más frecuente (Keiser *et al.*, 2002) (Supali *et al.*, 2010) (Lepper *et al.*, 2018). En este sentido el uso de técnicas de diagnóstico complementarias y el desarrollo de técnicas de detección múltiple que permitan detectar diferentes patógenos a la vez deberían de ser una prioridad a la hora de abordar un diagnóstico rápido y fiable de estas enfermedades y su control.

A partir del año 2000 e impulsados por los Objetivos de Desarrollo del Milenio, los principales países industrializados, liderados por los Estados Unidos, el Reino Unido y la Unión Europea, brindaron apoyo a gran escala para el control de diferentes enfermedades. Los principales programas de control dirigidos por la OMS y por entidades privadas (Fundación Bill y Melinda Gates y *Wellcome Trust*, entre otros) están focalizados principalmente a la administración masiva de fármacos, ya que es una de las medidas que presenta mayor coste-eficacia, recomendándose el tratamiento masivo una vez al año en zonas donde la prevalencia supere el 20% y de dos veces al año cuando sea mayor del 50%. En el año 2001, en la 54ª Asamblea Mundial de la Salud, se aprobó por unanimidad la resolución WHA54.19 en la que se instaba a los países endémicos a afrontar el problema de los helmintos. En el año 2012 tuvo lugar la Declaración de Londres donde diversas compañías farmacéuticas (Glaxo SmithKline y Johnson & Johnson) se comprometieron a donar los tratamientos necesarios para el control de las geohelmintiasis. Según los datos de 2017 publicados en el Fondo Global de Innovación para NTDs, conocido como *G-FINDER*, el dinero destinado a combatir las helmintiasis humanas en el año 2016 fue de 74,6 millones de dólares, del cual gran parte (44 millones de dólares) se destinó al control de tres enfermedades: esquistosomiasis, filariasis linfática y oncocercosis; mientras que el resto de las infecciones producidas por helmintos recibieron menos de 4 millones cada una. Por otro lado, dentro del programa Europeo Horizonte 2020 (H2020), se

contempla el objetivo específico de eliminar la morbilidad causada por las helmintiasis transmitidas por el suelo en los niños en edad escolar mediante tratamiento periódico de al menos el 75% de niños en riesgo en zonas endémicas, que según los cálculos de 2016 supondría unos 836 millones de niños, principalmente concentrados en países del África subsahariana y la India.

Debido a que las geohelmintiasis encabezan la lista de las 7 NTDs más prevalentes, en 2012 se inició una campaña de control llamada [END7](#), impulsada por el Instituto de Vacunas Sabin, que tiene como finalidad obtener apoyo público y, de hecho, ya se ha conseguido recaudar, gracias a la utilización de diferentes plataformas informáticas, unos 1,2 millones de dólares para los programas de tratamiento masivo en una docena de países.

El tratamiento de elección para las geohelmintiasis empleado en los programas de control de la OMS es principalmente albendazol (400 mg) o mebendazol (500 mg) en dosis única, aunque también se recomienda el levamisol (40 mg o 2,5 mg/kg) y el pamoato de pirantel (250 mg o 10 mg/kg) combinado generalmente con oxantel (100 mg). Sin embargo, todos ellos son fármacos poco efectivos frente a la estrongiloidiasis, cuyo control únicamente se beneficia de forma colateral a través de las medidas implementadas para el control de las filariasis ([Means et al., 2016](#)) con la ivermectina como fármaco de elección. El programa [DeWorm3](#), una iniciativa del Museo de Historia Natural de Londres junto a la Fundación Bill y Melinda Gates, surgió con el fin de demostrar la viabilidad de utilizar Plataformas integradas para interrumpir la transmisión de infección por STHs, a través de enfoques basados en la administración masiva de fármacos en entornos donde previamente se han implementado con éxito programas de control de la filariasis linfática.

El éxito del tratamiento es muy variable, tanto es así que las tasas de eficacia al utilizar una dosis de albendazol, forma de tratamiento más común en este tipo de intervenciones, son diferentes para cada geohelminto, siendo más efectivo frente a *A. lumbricoides* (tasa de efectividad del 98%), seguido de un 88% de efectividad para las uncinarias y un 47% en el caso de *T. trichiura*, reduciéndose estas tasas si el tratamiento se realiza con mebendazol ([Vercruysse et al., 2011](#)) ([Soukhathammavong et al., 2012](#)). Otro fármaco, la ivermectina, presenta una mayor efectividad, pero su elevada toxicidad y afectación del sistema nervioso hace que esté contraindicada en niños menores de 3 o 5 años, que pesen menos de 15 kg o midan menos de 90 cm y en mujeres embarazadas o lactantes, lo cual restringe su entrada en los planes de acción de la OMS de tratamiento masivo. Además es importante saber que este fármaco está contraindicado en zonas endémicas de *Loa loa*, ya que puede provocar graves

consecuencias en pacientes con un elevado número de microfilarias, elevándose el riesgo de reacción sistémica severa e incluso pudiendo provocar la muerte. Un hecho también importante a la hora de aplicar las medidas de control es conocer las actividades ocupacionales sujetas a riesgo (Guyatt, 2000) (Bethony *et al.*, 2002) y la edad de los individuos en riesgo (Halwindi *et al.*, 2017) ya que son factores determinantes que inciden en la prevalencia e intensidad de las infecciones por helmintos (Brooker *et al.*, 2004), como ya apuntan algunos estudios donde se describe un mayor riesgo de discapacidad por sufrir ascariasis o tricuriasis en el grupo de 5 a 15 años de edad, o de uncinariasis en adultos de 20 a 25 años de edad (Truscott *et al.*, 2015) (Lim *et al.*, 2018). Por otro lado, también hay que tener en cuenta la existencia de reinfecciones que pueden ocurrir inmediatamente después de haber sido curados con el tratamiento, el fallo terapéutico o la posibilidad de generar resistencias (Speich *et al.*, 2016).

Por tanto, existen numerosas causas por las que el abordaje de los programas de control de las geohelmintiasis no debe realizarse de forma unidimensional y deberían plantearse nuevas estrategias (Lo *et al.*, 2016). Un ejemplo claro de ello es la estrategia WASH (*Water, Sanitation, Hygiene*) en el que se incluyen por un lado mejoras en las infraestructuras, con instalación de letrinas o de acceso a agua corriente y por otro, reforzar la educación sanitaria y la promoción de la higiene personal y en los hogares (Campbell *et al.*, 2016). Estas medidas ya se han evaluado estos últimos años (Bird *et al.*, 2014) (Njuguna *et al.*, 2016) (Kumwenda *et al.*, 2017) (Paige *et al.*, 2017), proporcionando notables mejoras en la reducción de casos de estas helmintiasis. Por supuesto, no podemos olvidar que la búsqueda de nuevos fármacos y el desarrollo de posibles vacunas se encuentran también entre las estrategias prioritarias de control de las geohelmintiasis (Hotez *et al.*, 2008).




2. Objetivos

2. Objetivos

El estado actual del diagnóstico de las geohelmintiasis incluida la estrongiloidiasis presenta diversas limitaciones debido a las herramientas disponibles para la detección de los parásitos responsables de ellas. La sensibilidad y especificidad de las técnicas diagnósticas están sujetas a mejora y además, disponer de una plataforma multiplex que nos permita el diagnóstico de los geohelminthos responsables de las geohelmintiasis humanas de forma conjunta, a partir de una única muestra, supondría un gran avance. Por ello, el objetivo principal de este estudio es la mejora del diagnóstico de las infecciones generadas por *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *N. americanus*, *A. duodenale* y *S. stercoralis*, estableciéndose los siguientes objetivos concretos:

1. Desarrollar un ELISA para la detección de subclases de isotipos de inmunoglobulinas G1 y G4 anti-*Strongyloides* spp. y un ensayo de *Western Blot* para identificar posibles proteínas de *Strongyloides* spp. con potencial interés diagnóstico.
2. Evaluar la técnica ELISA de detección de subclases de isotipos y el *Western Blot* en muestras clínicas de sueros de pacientes, inmigrantes o viajeros, con sospecha de padecer estrongiloidiasis.
3. Aplicar la técnica de ELISA de detección de subclases de isotipos en muestras de suero de población general en zona endémica (Etiopía).
4. Optimizar una multiplex-PCR en tiempo real para la detección de los diferentes geohelminthos.
5. Evaluar la técnica multiplex-PCR en muestras clínicas de heces de pacientes, inmigrantes o viajeros, con sospecha de padecer geohelmintiasis.
6. Aplicar la técnica multiplex-PCR en muestras de heces de población adulta y escolar en zona endémica (Mozambique y Angola).

The background is a light yellow gradient. A large, semi-transparent yellow diamond shape is positioned on the right side. On the left, there is a large, vertically-oriented oval shape with a complex geometric pattern in shades of brown and gold. A smaller, solid brown oval is nested within the larger patterned oval, partially overlapping the yellow diamond.

3. Material y Métodos

3. Material y métodos.

3.1. Material biológico.

3.1.1. Muestras de parásitos.

- *Strongyloides venezuelensis*: larvas de tercer estadio (L3), obtenidas por el método de Baermann a partir de muestras de heces de ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) infectadas experimentalmente y cedidas por el grupo del Prof. Antonio Muro de la Universidad de Salamanca.
- *Ascaris lumbricoides*: huevos y un adulto expulsado por un paciente procedente de Argentina y remitido por la Dra. M^a Victoria Periago de la Fundación Mundo Sano/CONICET, así como un adulto procedente de un paciente del Hospital de Poniente (Almería), cedido por el Dr. Joaquín Salas.
- *Ancylostoma duodenale*/*Necator americanus*: larvas procedentes de cultivos en placa de agar a partir de muestras de heces de pacientes del Hospital Vall d'Hebrón (Barcelona), cedidas por la Dra. Elena Sulleiro.
- *Trichuris muris*: huevos y adultos obtenidos a partir de muestras de heces y necropsias de ratón (*Mus musculus*) infectados experimentalmente y cedidos por el grupo del Prof. Antonio Muro de la Universidad de Salamanca.

3.1.1.1. ADN

- Se dispuso de ADN de diferentes parásitos: *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Blastocystis* sp., *Echinococcus granulosus* s.l., *Loa loa*, *Mansonella* spp. y *Anisakis* spp. que fueron cedidos por el personal del Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (Madrid).

3.1.2. Muestras biológicas humanas.

3.1.2.1. Sueros.

- Se ha dispuesto de una batería de sueros (n=103) procedentes de la seroteca anonimizada de la Unidad de Diagnóstico serológico de parásitos, del Laboratorio de Referencia e Investigación en Parasitología del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Estas muestras pertenecían a pacientes que fueron categorizados en 4 grupos:
 - Grupo 1) Pacientes con estrongiloidiasis parasitológicamente confirmada (n=10).

- Grupo 2) Pacientes con sospecha de estrongiloidiasis (sin datos de diagnóstico parasitológico) que presentaban serología positiva por IVD *Kit Strongyloides* IgG ELISA (DRG Instruments GmbH, Alemania) y clínica compatible (n=43).
- Grupo 3) Pacientes con serología negativa a *Strongyloides* spp. por IVD *Kit Strongyloides* IgG ELISA, pero positiva a otras helmintiasis (*Toxocara* spp., *Schistosoma* spp., filarias) (n=20).
- Grupo 4) Donantes negativos sin sospecha de estrongiloidiasis y otras helmintiasis, sin viajes ni residencia en zonas endémicas, con técnicas serológicas y parasitológicas negativas (n=30).
- Muestras de sueros de pacientes reclutados entre julio de 2014 y mayo de 2017 en 6 hospitales del Sistema Nacional de Salud (SNS): Hospital Clínic (Barcelona), Hospital San Pau (Barcelona), Hospital del Mar (Barcelona), Hospital de Bellvitge (Barcelona), Hospital de Poniente (Almería) y Hospital Vall d'Hebrón (Barcelona), dentro del marco del proyecto “Hacia la implementación del cribado sistemático de estrongiloidiasis en personas de riesgo: mejoras en el diagnóstico y evaluación de estrategias de prevención”, concedido al Centre de Recerca en Salut Internacional de Barcelona (CRESIB) y financiado por la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI) y la Real Federación Española de Fútbol (RFEF). Los criterios de inclusión en este estudio fueron: ser mayor de 18 años, residencia de más de un año en zona endémica (Centroamérica y Suramérica, África y Asia), presentar serología positiva a *Strongyloides* spp. y/o presencia del parásito en heces y tener firmado el consentimiento informado.
- Muestras séricas de individuos etíopes recogidas a lo largo del año 2017 por la Dra. Arancha Amor y D. Melaku Anegagrie dentro del proyecto “*Strategies for the control of Strongyloides stercoralis and other soil transmitted helminths in a high prevalence area of Bahir Dar, Amhara Region, Ethiopia.*” en el que colaboran la Fundación Mundo Sano, el Instituto de Salud Carlos III y la Universidad de Bahir Dar. Los criterios de inclusión considerados fueron: ser mayor de 5 años, vivir en las áreas seleccionadas durante al menos tres meses desde la primera visita del trabajador de campo y tener firmado el consentimiento informado.

3.1.2.2. Heces.

- Muestras de heces de donantes sanos españoles, obtenidos bajo consentimiento informado y bajo los requisitos de no haber viajado nunca a zona endémica, ni presentar sintomatología compatible.
- Muestras de heces de viajeros españoles a zona endémica e inmigrantes procedentes de zona endémica con sospecha de padecer geohelmintiasis que fueron recogidas por cuatro hospitales del SNS: Hospital de Poniente (Almería), Hospital Vall d’Hebrón (Barcelona), Unidad de Salud Internacional de Drassanes (Barcelona) y Hospital Severo Ochoa (Madrid), dentro del proyecto del Programa de Acción Estratégica en Salud Intramural (AESI): “Desarrollo de técnicas moleculares para el diagnóstico y control de multi-infecciones por geohelminths y por *Strongyloides stercoralis*.” Los criterios de inclusión definidos fueron: pacientes inmigrantes o viajeros procedentes de zona endémica (áreas tropicales o subtropicales de África, Asia, América Latina u Oceanía), con posibilidad de padecer geohelmintiasis por presentar clínica compatible.
- Muestras de heces procedentes de individuos de dos zonas endémicas concretas:
 - Muestras de heces de población infantil de Angola, de edades comprendidas entre 5-14 años, de 16 escuelas dentro del municipio de Cubal, provincia de Benguela, que fueron recogidas en el período de enero a junio de 2015, en el marco del proyecto “Estudio de la prevalencia de infección por *Strongyloides stercoralis* y otros geohelminths en Cubal (Angola)” en el que participan la Fundación Mundo Sano, la Universidad de Salamanca, el Instituto de Salud Carlos III (Madrid), el Hospital Vall d’Hebrón (Barcelona) y el Hospital Nossa Senhora da Paz (Cubal).
 - Muestras de heces de población general de Mozambique de la provincia de Maputo, recogidas en el terreno durante el periodo de julio de 2017 a mayo de 2018, dentro del proyecto “*Baseline surveillance platform for the monitoring of the emergence of antihelmintic resistance in Manhica district (MARS)*” llevado a cabo por el personal del Instituto de Salud Global (Barcelona), el Hospital Clínic (Barcelona) y el Centro de Investigação em Saúde da Manhica (Mozambique), y muestras obtenidas en la provincia de Zambezia durante el periodo de octubre de 2017 a enero de 2018 dentro del proyecto “Epidemiología molecular de protozoos intestinales en niños de la provincia de Zambezia (Mozambique)”, cedidas por D. Aly Salimo Omar Muadica y el Dr. David Carmena del Instituto de Salud Carlos III (Madrid).

3.1.3. Aspectos éticos.

En todo momento se garantizó la protección de la intimidad personal y el tratamiento confidencial de los datos, conforme a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, reemplazada por el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, y en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales (B.O.E. de 6 de diciembre 2018), y se cumplió con los requisitos éticos y legales recogidos en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica y en el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, (B.O.E de 2 de diciembre de 2011) por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano. Asimismo se cumplió con lo establecido por los Comités Éticos de cada centro colaborador.

3.2. Áreas geográficas estudiadas.

3.2.1. España.

España tiene una superficie geográfica de 505.370 Km², siendo el cuarto país en extensión de Europa. El territorio está dividido en 17 comunidades autónomas, divididas en cincuenta provincias, y dos ciudades autónomas. Las muestras de viajeros españoles e inmigrantes llegados a nuestro país con sospecha de padecer geohelmintiasis analizadas en este estudio fueron recogidas en 8 hospitales ubicados en Barcelona, Almería y Madrid. Con respecto a los inmigrantes, éstos procedían de Argentina, Bolivia, Brasil, Camerún, Colombia, Cuba, Ecuador, El Salvador, Filipinas, Gambia, Ghana, Guinea Ecuatorial, Guinea Bissau, Honduras, Mali, Marruecos, Montenegro, Nigeria, Panamá, Paraguay, Perú, Polonia, Portugal, República Dominicana, Senegal, Uruguay y Venezuela. En cuanto a los viajeros, los destinos fueron: Angola, Brasil, Burkina Faso, Congo, Costa Rica, Cuba, Honduras, Marruecos, República Dominicana, Senegal, Tailandia, Taiwán y Uruguay.

3.2.2. Angola.

La República de Angola presenta una superficie de 1.246.700 Km², siendo el sexto país en extensión de África. El territorio incluye 18 provincias divididas en municipios, subdivididos a su vez en comunas. Los barrios y poblaciones son la división administrativa menor en ciudades y medio rural, respectivamente. El Hospital Nossa Senhora da Paz, donde se ha llevado a cabo nuestro estudio, está ubicado a las afueras de Cubal, en Tchambungo, provincia de Benguela. Este hospital es de carácter privado, está gestionado por las hermanas de la Compañía de Santa Teresa de Jesús y asociado a una de las escuelas incluidas en el estudio (Teresianas). En su origen, actuaba únicamente como dispensario pero las

circunstancias de la guerra civil en el país, que duró casi 30 años (1975-2002), le obligaron a transformarse en hospital, siendo ahora uno de los principales centros de referencia de tuberculosis en Angola. Las muestras de heces de población infantil empleadas en este trabajo procedían de la provincia de Benguela, en el municipio de Cubal, el cual está dividido en 4 comunas: Tumbulo, Cubal, Capupa y Yambala. Las muestras se recogieron en un total de 16 escuelas distribuidas de forma igualitaria en las 4 comunas: comuna Tumbulo (Tumbulo Sede, Kalamuma, Kambinji, Lulambo), comuna Cubal (García Neto, Tomás Ferreira, Comandante Bula, Teresianas), comuna Capupa (Loneta Halu, Hoji-ha-henda, Caviva Sul, Cassua) y comuna Yambala (Kambondiongolo, Kassalasitu, Yamba Sede, Atiopo) (**Figura 1**).

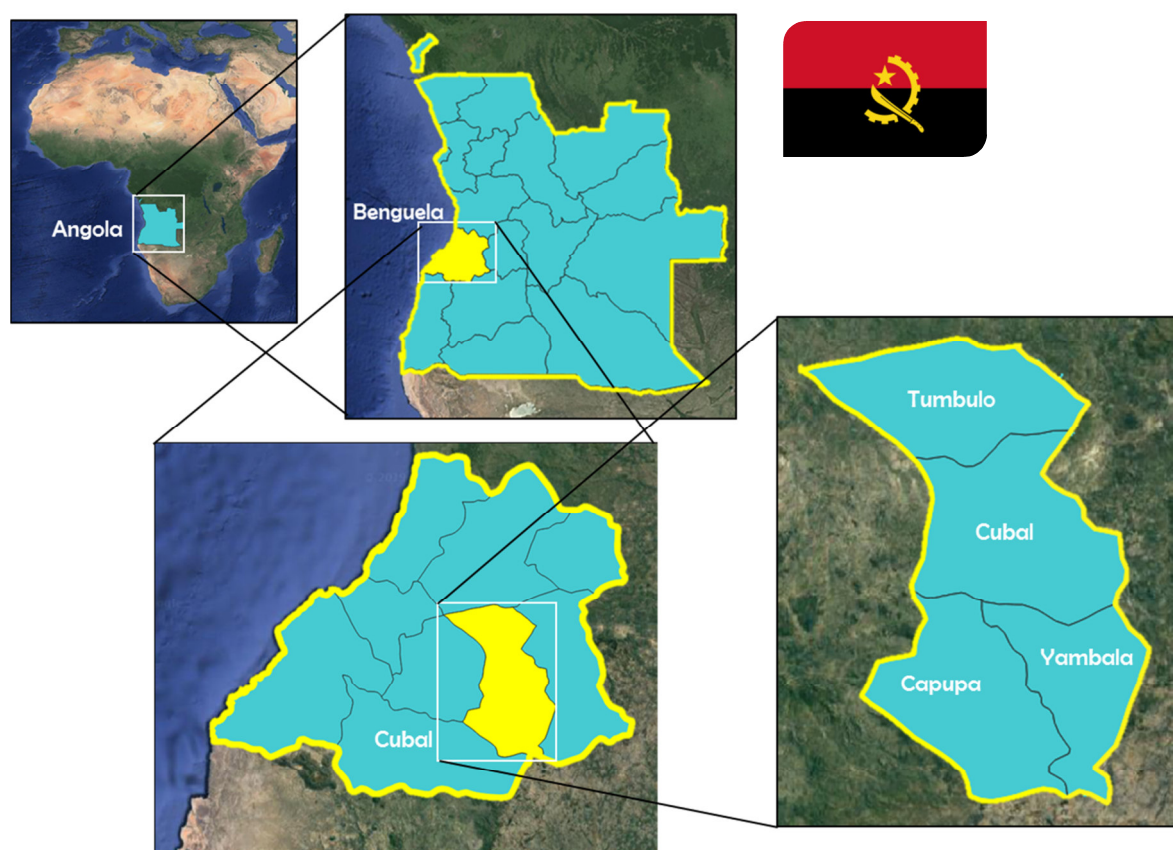


Figura 1. Localización geográfica de los diferentes puntos de muestreo en la provincia de Benguela, Angola. Detalle de las cuatro comunas estudiadas en el municipio de Cubal: Tumbulo, Cubal, Capupa y Yambala (elaboración propia mediante el programa Q-GIS).

3.2.3. Etiopía.

La República Democrática Federal de Etiopía con una extensión de 1.221.900 Km², es el segundo país más poblado del continente africano (94,1 millones de habitantes, en 2013)

(Ministerio de Asuntos Exteriores, 2019). El territorio está dividido en 9 regiones y dos ciudades administrativas. Las regiones se dividen en zonas, *sub-cities*, *woredas* y *gotts*. Este estudio se ha realizado en el laboratorio del *Regional Health Bureau Research Laboratory* ubicado en la ciudad de Bahir Dar construido por el Carter Center de Atlanta. Las muestras séricas se recogieron de forma aleatoria en un total de 260 casas distribuidas de forma igualitaria en 5 de los 13 *gotts* de la *woreda* de Bahir Dar Zuria (Gedro, Kurbi, Mazoria, Sesaberet y Zenzelema), zona de West Gojam de la región de Amhara (**Figura 2**).

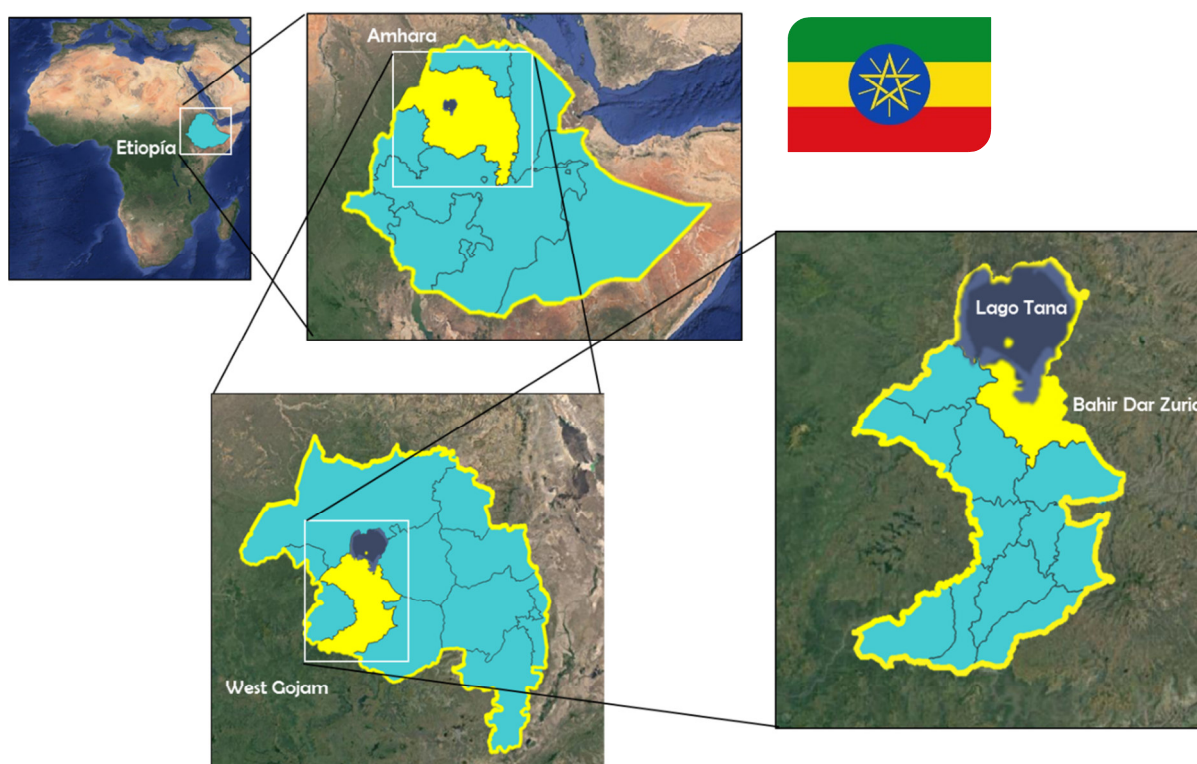


Figura 2. Localización geográfica de los puntos de muestreo de la región de Amhara, Etiopía. Detalle de la zona West Gojam y *woreda* Bahir Dar Zuria (elaboración propia mediante el programa Q-GIS).

3.2.4. Mozambique.

La República de Mozambique abarca una superficie de 799.380 Km² con 10 provincias divididas a su vez en distritos, y éstos en puestos administrativos que pueden incluir varias localidades. Las muestras analizadas proceden de la provincia de Maputo, de 6 zonas en el distrito de Manhica: Manhica Sede, Fevereiro, Xinavane, Maluana, Calanga, Ilha Josina, y de diez distritos de la provincia de Zambezia: Gurúe, Alto Molócue, Ile, Lugela, Mocuba, Namacurra, Nicoadala, Quelimane, Mopeia y Morrumbala (**Figura 3**).

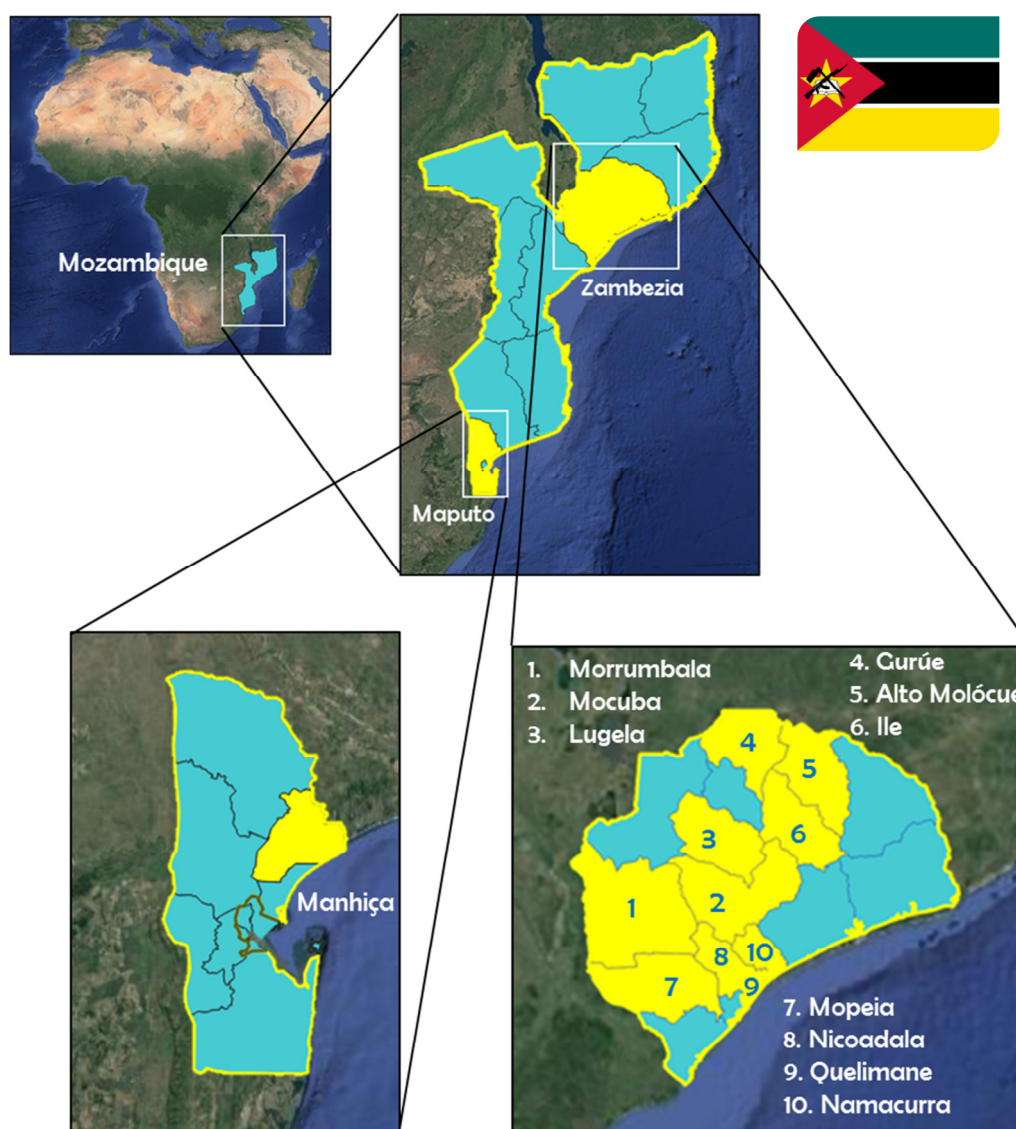


Figura 3. Localización geográfica de los diferentes puntos de muestro en las provincias de Maputo y Zambezia, Mozambique. Detalle del distrito de Manhiça y de los distritos de Morrumbala, Mocuba, Lugela, Gurúe, Alto Molócue, Ile, Mopeia, Nicoadala, Quelimane y Namacurra (elaboración propia mediante el programa Q-GIS).

3.3. Métodos.

3.3.1. Técnicas parasitológicas convencionales.

Las técnicas parasitológicas empleadas en este estudio: visualización directa, cultivo en agar, técnica de Baermann, Kato-Katz y Tellemán se realizaron en los diferentes hospitales siguiendo los protocolos estandarizados para cada uno de ellas.

3.3.2. Método ELISA comercial para la detección de anticuerpos IgG frente a *Strongyloides* spp.

Se utilizó el kit *Strongyloides* IgG ELISA IVD (DRG Instruments GmbH, Marburg, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando los reactivos suministrados en el kit. Las muestras de suero fueron diluidas a la dilución 1/64 en tampón de dilución, transfiriéndose 100 µl de dichas diluciones a los pocillos de las placas sensibilizadas suministradas en el kit. En cada ensayo se utilizaron 2 blancos (pocillos que contenían todos los reactivos de la reacción excepto la muestra de suero), un control negativo y un control positivo proporcionados por el kit. Las placas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con 200 µl/pocillo de solución de lavado. A continuación, se añadieron 100 µl/pocillo de conjugado enzimático y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. De nuevo se lavaron las placas tres veces con solución de lavado (200 µl/pocillo) y se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato. Tras una incubación, de 5 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, se añadieron 100 µl/pocillo de solución de parada y se realizó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm con referencia a 620 nm en un espectrofotómetro Multiskan FC (Thermo Scientific, España).

El resultado se expresó en índice que se obtuvo al realizar el cociente entre la densidad óptica (DO) de la muestra y el valor de *cut off* establecido por la casa comercial. Se consideró un resultado positivo cuando el índice obtenido fue mayor de 1,1; indeterminado con un valor de índice entre 1 y 1,1; y negativo con un valor menor de 1.

3.3.3. Método ELISA “in house” para la detección de anticuerpos IgG1 e IgG4 frente a *Strongyloides* spp.

3.3.3.1. Obtención del antígeno a partir de larvas L3 de *S. venezuelensis*.

Para la obtención del antígeno se siguió el protocolo descrito por Ruano *et al.* (2012) con ligeras modificaciones. Primero, las larvas en estadio L3 se resuspendieron a una concentración de 2×10^5 larvas/ml en tampón fosfato salino (PBS) (0,46 mM NaCl; 0,002 mM KCl; 0,0081 mM Na_2HPO_4 ; 0,001 mM KH_2PO_4 ; pH=7.2) y empleando como inhibidores de proteasas 1x PiA (1mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); 1 mM ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'-tetraacético (EGTA)) y 1x PiB (1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF); 0,1 mM tosil-L-fenilalanina clorometil cetona (TPCK); 1mM pepstatina) (Maizels, 1991). A continuación, la suspensión se homogenizó en tubos Potter durante 30-60 minutos en baño de hielo y agua, y posteriormente se sonicó con 8 ciclos de 20 segundos a 20 kHz. El homogeneizado se centrifugó a 13.000 g durante 30 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se almacenó a -20 °C hasta su utilización (Ruano *et al.*, 2012).

La concentración de proteínas de la fracción antigénica se determinó por el método del ácido bicinonínico (BCA) empleando el kit *Pierce Protein Assay* (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU). El extracto proteico se analizó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12,5% con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie.

3.3.3.2. Ensayo inmunoenzimático

Las placas Nunc MaxiSorp™ de 96 pocillos (ThermoFisher, Massachussets, EEUU) se sensibilizaron con 50 µl/pocillo del antígeno indicado en el apartado anterior a distintas concentraciones en tampón carbonato (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, 0,02% NaN₃; pH 9,6) y se almacenaron a 4°C durante toda la noche.

Las placas una vez sensibilizadas, se bloquearon con 200 µl/pocillo de PBS conteniendo 1% de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) y 0,2% Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO, EEUU), durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se lavaron 3 veces con 250 µl/pocillo de solución de lavado (PBS pH 7,4 y 0,1% Tween-20) y a los correspondientes pocillos se añadieron 50 µl de las muestras y de los distintos controles a diferentes diluciones con tampón de dilución (PBS con 0,1% BSA y 0,02% Tween 20). En cada ensayo se utilizaron dos blancos (2 pocillos conteniendo todos los reactivos de la reacción, excepto el suero), un control negativo (una muestra de suero de un individuo sano perteneciente al grupo 4 definido en el apartado 3.1.2.1. de este capítulo) y un control positivo (una muestra de suero de un paciente serológicamente positivo –grupo 3 del apartado 3.1.2.1. de este capítulo–). Las placas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C y se lavaron 5 veces con 250 µl/pocillo de solución de lavado. Posteriormente, se añadieron 50 µl de anticuerpos de ratón anti IgG1 o anti IgG4 humanas, conjugados con peroxidasa de rábano (Southern Biotech, Birmingham, Reino Unido) a las diluciones correspondientes en tampón de dilución, y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C.

Tras lavar las placas 5 veces con 250 µl/pocillo de solución de lavado, se añadieron 100 µl/pocillo de sustrato ABTS [2,2-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) sal de diamonio] a una concentración de 0,5 mg/ml en *buffer* fosfato-citrato con perborato sódico (Sigma, St. Louis, MO, EEUU). Por último, se incubaron durante 30 minutos en oscuridad, a temperatura ambiente, y se frenó la reacción con 100 µl/pocillo de dodecilsulfato sódico (SDS) al 5%. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Sirio S (Radim, Italia) a una longitud de onda de 450 nm con referencia a 620 nm, sustrayendo el valor del blanco a todos los pocillos.

Una vez optimizado este protocolo se realizó de forma automatizada en el sistema automático para test ELISA Basic Radim Immunoassay Operator (BRIO) SEAC (Radim Diagnostics, Italia) que permite analizar 4 microplacas de 96 pocillos de forma simultánea. Se llevó a cabo la programación del *software* para la ejecución del protocolo y de la emisión de los resultados en índices según lo indicado a continuación.

El resultado se expresó en índice que se obtuvo al realizar el cociente entre la densidad óptica (DO) de la muestra y el valor de *cut off* establecido para la técnica según lo indicado en el siguiente apartado 3.3.1.3. Se consideró un resultado positivo cuando el índice obtenido fue mayor de 1,1; indeterminado con un valor de índice entre 1 y 1,1; y negativo con un valor menor de 1.

3.3.3.3. Establecimiento de los valores de *cut off* o puntos de corte.

El cálculo del valor de *cut off* se estableció mediante curvas ROC (*Receiver Operation Characteristics*) utilizando el programa estadístico IBM®SPSS® Statistics Version 18 (Burgueño, 1995). Para ello se utilizaron los sueros de individuos previamente categorizados como verdaderos positivos (grupo 1 del apartado 3.1.2.1.), y negativos (grupo 2 del apartado 3.1.2.1), permitiéndonos seleccionar el punto de corte que proporcionó unos mejores valores de sensibilidad y especificidad.

3.3.4. Método *Western Blot*.

3.3.4.1. Electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (1970) y revisado por Hames (Farmer, 1986). La electroforesis se realizó en geles discontinuos de 10,1 x 7,3 cm, con una fase de empaquetamiento al 4%, utilizando la solución *Ultra Pure Protogel*® (National Diagnostics, USA) de acrilamida al 30% y bis-acrilamida al 0,8% (37,5:1), en *buffer* de empaquetamiento (Tris/HCl-SDS; pH 6,8) con persulfato de amonio al 10% (Sigma, St. Louis, MO, EEUU) y N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) (Sigma, St. Louis, MO, EEUU), y una fase de separación con la solución *Ultra Pure Protogel*® al 12,5% en *buffer* de separación (Tris/HCl-SDS; pH 8,8) conteniendo persulfato de amonio al 10% y TEMED. Para la electroforesis se utilizó el sistema vertical Mini-PROTEAN® (BioRad, Richmond, CA, EEUU). Como patrón de peso molecular se utilizó el marcador *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards* (BioRad, Richmond, CA, EEUU) con un rango de 10 a 250 kDa. Las muestras se desnaturalizaron a 100 °C durante 5 minutos en el tampón *Laemmli Sample Buffer* (BioRad, Richmond, CA, EEUU) (65,8 mM Tris-HCl, 26,3% (w/v) glicerol, 2,1% SDS, 0,01% azul de bromofenol, 355 mM 2-

mercaptoetanol), y se aplicaron al gel 15 µg/pocillo del patrón de peso molecular y 150 µg/pocillo del extracto proteico analizado (obtenido de acuerdo al apartado 3.3.3.1. para el ensayo inmunoenzimático) utilizando un peine preparativo. La migración electroforética se realizó a una intensidad de corriente constante de 50 mA hasta que el frente alcanzó la fase separativa, y entonces, se incrementó a 80 mA.

3.3.4.2. Electrotransferencia de gel a membrana.

Una vez separadas las proteínas en función de su peso molecular, se realizó su transferencia a membranas de nitrocelulosa AmershamTM ProtranTM Premium 0,2 NC de un tamaño de poro de 0,2 µm (GE Healthcare Life Sciences, Germany). Para ello se utilizó un aparato de electrotransferencia húmedo *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (BioRad, Richmond, CA, EEUU) y un tampón de transferencia conteniendo 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol; pH 8,3. La electrotransferencia se realizó mediante la aplicación de una intensidad de corriente constante de 300 mA durante 1 hora a 4 °C.

3.3.4.3. Ensayo de enzimoimmunoanálisis sobre membrana de nitrocelulosa.

La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con una solución del 5% de leche desnatada en polvo en PBS durante toda la noche a 4 °C en un agitador de balanceo. Dicha membrana se lavó 3 veces con solución de lavado (PBS con Tween 20 al 0,05%), en agitación durante 10 minutos, y se cortó en tiras de 0,3 cm de ancho. Cada una de las tiras se incubaron con los sueros correspondientes a la dilución 1/100 en PBS conteniendo un 1% de leche desnatada en polvo, durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Las tiras se lavaron 3 veces con solución de lavado en agitación durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió un anticuerpo de ratón anti IgG totales humanas, conjugado con peroxidasa de rábano (Southern Biotech, Birmingham, Reino Unido) a la dilución 1/3000 en PBS con 1% de leche desnatada en polvo, incubándose durante una hora a temperatura ambiente en agitación. De nuevo las tiras se lavaron 2 veces con solución de lavado, y se realizó un tercer lavado sólo con PBS, todos ellos en agitación durante 10 minutos. A continuación, se añadió el sustrato 4-cloro-1-naftol/3,3'-diaminobencidina, tetrahidrocloruro empleando el kit CN/DAB Substrate (Thermo Scientific, Inc, Rockford, IL, EEUU), de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial y se incubó durante 2 minutos en agitación. Por último, la reacción se frenó con agua destilada.

Para calcular el peso molecular de las bandas reactivas se construyó una curva patrón enfrentando el Factor de retención (Fr), calculado como la distancia que migra la proteína frente la distancia que migra el frente del gel, de cada una de las bandas calibradas del

marcador con sus correspondientes pesos moleculares. El peso molecular de cada proteína de interés se estimó mediante extrapolación de los correspondientes Frs en la curva patrón.

3.3.5. Concentración de las muestras de heces.

El método de concentración de las muestras se realizó a partir de 1 gramo de heces utilizando el sistema comercial de columnas Midi Parasep® SF (Leti diagnosis, Barcelona, España). La muestra se homogeneizó en 8 ml de solución salina y posterior agitación. A continuación, se colocó el filtro suministrado por la casa comercial y se centrifugó durante 5 minutos a 600 g. Una vez centrifugado, se eliminó el sobrenadante y el sedimento obtenido se resuspendió en 2 ml de solución salina y se repartió en dos tubos de 2 ml, que tras ser centrifugados durante 1 minuto a 16.200 g y eliminado el sobrenadante fueron almacenados a -20 °C hasta su utilización. En el caso de las muestras de heces procesadas en terreno (Angola, Etiopía y Mozambique), con el fin de optimizar los recursos, la concentración se realizó utilizando el kit Mini Parasep® SF (Leti diagnosis, Barcelona, España) a partir de 0,5 gramos de muestra de heces, 4 ml de solución salina y resuspendiéndose el sedimento en 1 ml de solución salina. A continuación se centrifugó durante 1 minuto a 16.200 g y tras la eliminación del sobrenadante el sedimento se almacenó a -20 °C hasta su utilización. La posterior extracción de ADN se realizó a partir de dichos concentrados.

3.3.6. Dopaje de muestras de heces

El dopaje de las muestras de heces se realizó a partir de las muestras de donantes sanos españoles que aparecen descritas en el apartado 3.1.2.2. de Material y Métodos. Para ello, en primer lugar se procedió al conteo de los huevos de *A. lumbricoides* y *T. trichiura* del material parasitario descrito en el apartado 3.1.1. de Material y Métodos) mediante cámara de Neubauer, obteniéndose 60 huevos/ μ l en el tubo de *A. lumbricoides* y 0,2 huevos/ μ l en *T. trichiura*. Según la literatura se considera una infección baja por *Ascaris* spp. cuando el hospedador presenta entre 10-15 huevos por gramo de heces (Pecson *et al.*, 2006), por este motivo consideramos oportuno realizar una contaminación con un número de huevos correspondiente a una infección medio baja (24 huevos/gramo de heces) y de 20 huevos/gramo de heces en el caso de *Trichuris* spp.

3.3.7. Extracción de ADN.

3.3.7.1. Extracción de ADN genómico a partir de parásitos.

La extracción de ADN genómico del fragmento de adulto de *A. lumbricoides* así como de las larvas de uncinarias procedentes de cultivo se llevó a cabo empleando el kit comercial QiAmp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Brevemente, el fragmento del adulto y las larvas fueron digeridos con 20 µl de proteinasa K en 180 µl de *buffer* ATL durante toda la noche a 56 °C. Al día siguiente, se añadieron 200 µl del *buffer* AL y se incubó 10 minutos a 70 °C. Después, se añadieron 200 µl de etanol (96-100 %), se agitó 15 segundos y esta mezcla se añadió a la columna, suministrada en el kit, que se centrifugó 1 minuto a 16.200 g. La columna se colocó en un nuevo tubo colector, se añadieron 500 µl de *buffer* AW1 y se centrifugó a 16.200 g durante 1 min. Se retiró el contenido del tubo colector, la columna se dispuso de nuevo en dicho tubo, se añadieron 500 µl de *buffer* AW2 y se centrifugó a 16.200 g durante 4 minutos. Por último, para eluir la columna, tras una centrifugación a 16.200 g durante 1 minuto, ésta se colocó en un tubo de 1,5 ml y se añadieron 200 µl de agua destilada estéril, atemperada a 56° C. Se incubó a temperatura ambiente un mínimo de 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 16.200 g durante 2 minutos. El ADN así obtenido se guardó a 4° C hasta su utilización.

La obtención de ADN genómico de las larvas de *S. venezuelensis* y de los adultos de *T. muris* se realizó mediante una extracción fenol/cloroformo (Sambrook, 1989). De forma breve, los parásitos se lavaron en 50 ml de PBS durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente, se eliminó el PBS y se añadieron 100 µl de solución salina, incubándose durante 10 minutos a 90 °C. Se añadieron 5 µL de proteinasa K (1 mg/ml) y se incubó toda la noche a 55 °C. Al día siguiente, de nuevo se incubó durante 10 minutos a 90 °C y se añadieron 100 µl de fenol/cloroformo (1:1) a los 100 µL de la muestra (v/v). Se agitó y centrifugó a 13.800 g durante 2 minutos. Al sobrenadante obtenido y recogido se le añadió el mismo volumen de una solución de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se agitó y centrifugó de nuevo a 13.800 g, durante 2 minutos, y el ADN se precipitó con 0,1 volumen de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío (-20 °C). Después, se incubó durante 30 minutos a 70 °C y se centrifugó durante 30 minutos a 13.800 g, a 4 °C. Por último, se descartó el sobrenadante y el sedimento se disolvió en 50 µl de agua destilada estéril y se almacenó a 4 °C hasta su uso.

3.3.7.2. Extracción de ADN a partir de muestras de heces.

Se utilizaron 4 kits comerciales de extracción de ADN a partir de las muestras de heces previamente concentradas según se describe en el apartado 3.3.4. de este capítulo. Todos ellos basados en la utilización de un sistema de columnas de sílice que retiene el ADN, pero con diferentes métodos de lisis para facilitar la rotura del potencial material parasitario presente en las heces.

3.3.7.2.1. Favorprep Stool DNA Isolation Mini Kit (IBIAN Technologies, Zaragoza, España).

Para la extracción por este método se añadieron 200 mg del concentrado de la muestra de heces de partida a un tubo conteniendo bolas de vidrio de diferentes tamaños, suministrado por la casa comercial, y se colocó en hielo. Después, se añadieron 300 µl de *buffer* SDE1 y 20 µl de proteinasa K (10 mg/ml). Se agitó durante 5 minutos y la mezcla se incubó a 60 °C durante 20 minutos, agitándose cada 5 minutos, y posteriormente a 95 °C durante 5 minutos. Se añadieron 100 µl de *buffer* SDE2, se agitó e incubó en hielo durante 5 minutos. La muestra se centrifugó a 18.000 g durante 5 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo de 1,5 ml añadiendo 200 µl de *buffer* SD3, se agitó y centrifugó a 18.000 g durante 2 minutos. De nuevo se transfirieron 250 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml y se añadieron 250 µl del *buffer* SDE4 y 250 µl de etanol (96-100%), transfiriéndose la mezcla a una columna SDE previamente colocada en un tubo colector. Se centrifugó a 18.000 g durante 1 minuto, se descartó el tubo colector y se introdujo la columna en uno nuevo. A continuación, se añadieron 750 µl de *buffer* de lavado previamente preparado según las instrucciones del kit, se centrifugó a 18.000 g durante 1 minuto, se descartó el contenido del tubo colector y se colocó de nuevo la columna en dicho tubo, repitiéndose el paso anterior de lavado. Por último para la elución de la columna, ésta se centrifugó a 18.000 g durante 3 minutos y se colocó en un tubo de 1,5 ml añadiéndose 100 µl de agua destilada estéril en el centro de la membrana, se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos y se centrifugó a 18.000 g durante 1 minuto. El ADN obtenido se almacenó a 4° C hasta su utilización.

3.3.7.2.2. PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO, Carlsbad, CA, EEUU).

El aislamiento de ADN se realizó a partir de 200 mg del concentrado de la muestra de heces añadiéndolos al tubo con bolas provisto en el kit y agitando suavemente para su mezcla. Después, se añadieron 60 µl de la solución C1 y se agitó durante 10 minutos a velocidad máxima en un vórtex con adaptador de tubos para 2 ml. Después, se centrifugó a 10.000 g durante 30 segundos y se transfirió el sobrenadante (aproximadamente 400-500 µl) a un tubo colector de 2 ml. Posteriormente, se añadieron 250 µl de la solución C2, se agitó e incubó a 4 °C en un baño de hielo y agua durante 5 minutos. Tras una centrifugación a 10.000 g durante 1 minuto, se transfirió el sobrenadante (600 µl) a un nuevo tubo colector de 2 ml, añadiendo 200 µl de la solución C3 y se agitó e incubó a 4 °C en un baño de hielo y agua durante 5 minutos. Se centrifugó de nuevo durante 1 minuto y se transfirió el sobrenadante (750 µl) a un nuevo tubo colector, al que se añadieron 1200 µl de la solución C4. De dicha mezcla, 675 µl se traspasaron a la columna suministrada en el kit, centrifugándose ésta a 10.000 g durante 1 minuto. Se descartó el contenido del tubo y se añadieron de nuevo otros

675 µl de la mezcla a la columna, centrifugándose en las mismas condiciones. A continuación, se añadieron a la columna 500 µl de la solución C5 y se centrifugó a 10.000 g durante 30 segundos. Se descartó el contenido del tubo y se centrifugó nuevamente a 10.000 g durante 1 minuto. Finalmente, para su elución se colocó la columna en un nuevo tubo colector, se añadieron 100 µl de agua destilada estéril y se centrifugó a 10.000 g durante 30 segundos. El ADN eluido se guardó hasta su uso a 4 °C.

3.3.7.2.3. QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania).

De acuerdo al protocolo del fabricante, se añadió 1 ml de *buffer* inhibitex a 200 mg del concentrado de la muestra de heces, se agitó y se incubó la suspensión durante 10 minutos a 95 °C. Tras ser agitada, la muestra se centrifugó durante 3 minutos a 16.200 g. En un tubo nuevo de 1,5 ml se añadieron 15 µl de proteinasa K, 200 µl de sobrenadante de la muestra y 200 µl de *buffer* AL, en ese orden, y se homogeneizó. Después se incubó a 70 °C durante 10 minutos, se añadieron 200 µl de etanol (96-100%) y se agitó. Posteriormente, se transfirieron 600 µl del lisado a la columna suministrada por el fabricante y se centrifugó durante 3 minutos a 16.200 g. La columna, a la que se añadieron 500 µl de *buffer* AW1, se colocó en un nuevo tubo colector y se centrifugó 1 minuto a 16.200 g. Nuevamente se colocó la columna, con 500 µl de *buffer* AW2, en un nuevo tubo colector, se centrifugó 3 minutos a 16.200 g y se descartó el tubo conteniendo el filtrado. La columna se colocó en un nuevo tubo y se centrifugó en las mismas condiciones. Por último, la columna se eluyó en un tubo de 1,5 ml con 200 µl de agua destilada estéril dispensados directamente en la membrana de la columna. Se incubó un mínimo de 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto a 16.200 g. El ADN obtenido se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

Este protocolo se realizó de forma automatizada en el aparato QIAcube (Qiagen, Hilden, Alemania) que permite extraer el ADN de doce muestras de forma simultánea, a partir de los 350 µl del sobrenadante obtenidos tras la primera centrifugación de la suspensión de los 200 mg del concentrado de heces con 1 ml de *buffer* inhibitex e incubada a 95 °C durante 10 minutos. Para el desarrollo del protocolo automatizado se empleó el programa *QIAamp DNA Stool* suministrado por la casa comercial.

3.3.7.2.4. Speedtools tissue DNA extraction Kit (Biotools, Madrid, España).

Para llevar a cabo la extracción del ADN, se añadió 1 ml de *buffer* TE a 200 mg del concentrado de la muestra de heces y se agitó durante 30 segundos. Después, la muestra se centrifugó durante 15 minutos a 4.000 g, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 0,2-1 ml de *buffer* BT1. En un tubo de 1,5 ml se añadieron 200 µL de la muestra resuspendida y 25 µL de proteinasa K. Después, se añadieron 200 µl de *buffer* de lisis BB3, se agitó durante 10-20 segundos y se incubó a 70 °C durante 10-15 minutos. Se

añadieron 210 µL de etanol (96-100%) al lisado y esta mezcla se transfirió a la columna provista en el kit. Se centrifugó durante 1 minuto a 11.000 g, se descartó el filtrado y se colocó la columna con 500 µL de *buffer* BBW en un nuevo tubo recolector. Se centrifugó 1 minuto a 11.000 g, se descartó el filtrado y se colocó la columna en el tubo recolector. Posteriormente, se añadieron 600 µL de *buffer* BB5, se centrifugó 1 minuto a 11.000 g, se descartó el filtrado y se colocó la columna en un tubo de 1,5 ml. Tras realizar una centrifugación en las mismas condiciones para secar la membrana, la columna se transfirió, para su elución, a un tubo de 1,5 ml al que se añadió en el centro de la membrana 100 µL de agua destilada estéril. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto, se centrifugó 1 minuto a 11.000 g y se almacenó hasta su uso a 4º C.

3.3.8. Cuantificación y pureza de los extractos de ADN.

La concentración y pureza del ADN se determinó mediante espectrofotometría en el equipo Nanodrop ND-1000 (NanoDropTechnologies, New York, USA). De esta manera, para llevar a cabo la cuantificación se midió la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm, mientras que para evaluar la pureza se utilizaron las relaciones de absorbancia a 260nm/280nm y a 260nm/230nm. Se considera que el ADN tiene una pureza óptima si el valor del cociente A260/280 se encuentra entre 1,8-2 y el de A260/230 entre 1,5-2,2 (Sambrook, 1989).

3.3.9. PCR en tiempo real para *Strongyloides* spp. con *SybrGreen*.

La técnica de PCR en tiempo real para la detección de *Strongyloides* spp. (PCR-rt-*Strongyloides* spp.) se realizó siguiendo el protocolo descrito por Saugar *et al.* (2015). La reacción se llevó a cabo un volumen final de 25 µL, usando 12,5 µL de Quantimix Easy Probes 2X (Biotools laboratorios, Madrid, España) que contiene la enzima ADN polimerasa, los 4 dNTPs, MgCl₂ y el tampón de reacción. Se utilizó el fluoróforo *SybrGreen* a una concentración de 0,3X (Invitrogen, San Diego, CA) y 0,2 µM de cada cebador específico para *Strongyloides* spp. diseñados a partir de la región del ARNr 18S descritos por Verweij *et al.* (2009) [Primer F: 5' GAATCCAAGTAAACGTAAGTCATTAGC 3'; Primer R: 5' TGCCTCTGGATATTGCTCAGTTC 3']. Por último, se añadió el ADN de la muestra a una concentración final de 5 ng/µl (Saugar *et al.*, 2015).

La amplificación constó de una desnaturalización del ADN de 15 minutos a 95 °C, seguido de 50 ciclos de desnaturalización de 10 segundos a 95 °C, alineamiento de 10 segundos a 60 °C y una elongación de 30 segundos a 72 °C. La lectura de fluorescencia se realizó al final de cada paso de extensión en cada uno de los ciclos de la reacción a una

longitud de onda de 470 nm de excitación y 510 nm de emisión. Posteriormente, se realizó una curva de *melting* de 50 a 99 °C con incrementos de 0,5 °C en cada paso. La amplificación y detección de fluorescencia fue llevada a cabo en un termociclador Corbett Rotor Gene™ 6000 real-time PCR system (Qiagen, Hilden, Alemania) y para el análisis de los datos se utilizó el programa Rotor Gene 6000 Series software versión 1.7. Se estableció una temperatura de *melting* (Tm) específica para los amplicones de *Strongyloides* spp. de 85±1 °C y se consideró una muestra como positiva cuando el producto de amplificación presentó esa Tm y su fluorescencia cruzó el umbral de forma exponencial.

En cada ensayo se utilizaron 6 controles: un blanco formado con la mezcla de todos los reactivos sin ADN, un control negativo perteneciente al ADN extraído de una muestra de heces de un donante sano (apartado 3.1.2.2. del presente capítulo), 3 controles positivos correspondientes al ADN genómico purificado de *S. venezuelensis* (cedido por el Dr. Pedro Fernández-Soto de la Universidad de Salamanca), dos de ellos a la concentración de 10 y 1 ng/μL que nos permitieron estandarizar la curva, y un control de inhibición añadiendo 10 ng de ADN de *S. venezuelensis* al ADN del control negativo. El análisis del ADN de las muestras de heces se realizó por duplicado para la detección de *Strongyloides* spp. y se incluyó un tercer tubo con cada muestra como control de inhibición al que se añadieron 10 ng de ADN de *S. venezuelensis*.

3.3.10. PCR multiplex en tiempo real para la detección de geohelminthos con sondas de hibridación.

3.3.10.1. Cebadores y sondas de hibridación.

El diseño de los cebadores y sondas utilizados en este estudio se realizó utilizando las secuencias descritas por Llewellyn *et al.* (2016) con ligeras modificaciones (Llewellyn *et al.*, 2016). Brevemente, por un lado se sustituyó el motivo MGB (*Minor Groove Binder*) en el extremo 3' de las sondas por la intercalación de LNAs (*Locked Nucleic Acid*) señalizados con el signo “+” y por otro, se modificaron los fluoróforos en función de la disponibilidad de los canales existentes en nuestro termociclador. Las secuencias de oligonucleótidos tanto de los cebadores como de las sondas, con sus respectivos fluorocromos, el tamaño de amplicón, la región de amplificación y el número de acceso en GenBank a partir del cual se diseñaron aparecen recogidas en la **Tabla 4**.

Especie	Secuencia oligonucleotídica 5'—3'	Tamaño amplificación	Región	Conc. Final nM	nº GenBank	Referencias
<i>Strongyloides</i> spp.	Directo GAATCCAAAGTAAACGTAAGTCATTAGC			100		
	Reverso TGCCTCTGGATA TTGCTCAGTTC			100		Verweij <i>et al.</i> , (2009)
	Sonda FAM-ACACACCGCCGCTCGCTGC- BHQ1	101 pb	18S ARNr	100	AF279916	
<i>Ancylostoma</i> spp.	Directo GAATGACAGCAAACTCGTTGTTG			100		
	Reverso ATACTAGCCACTGCCGAAACGT			100		Llewellyn <i>et al.</i> , (2016)
	Sonda YAK-AT+CGTTTA+CCGA+CTTTAG-BHQ1	71 pb	ITS1	100	EU344797.1	
<i>Ascaris</i> spp.	Directo GTAATAGCAGTCGGCGTTTCTT			60		
	Reverso GCCCAACATGCCACCTATT			60		Llewellyn <i>et al.</i> , (2016)
	Sonda ROX -TTGGCGGACAATTGCATGCGAT- BBQ	88 pb	ITS1	100	AB571301.1	
<i>Necator americanus</i>	Directo CTGTTTGTCGAACGGTACTTGC			100		
	Reverso ATAACAGCGTGACACATGTTGC			100		Llewellyn <i>et al.</i> , (2016)
	Sonda CY5 -CTGTA+CTA+CG+CATTGTATAC-BBQ	101 pb	ITS2	100	AJ001599.1	
<i>Trichuris trichiura</i>	Directo TCCGAACGGCGGATCA			60		
	Reverso CTCGAGTGTACAGTCGTCCTT			60		Llewellyn <i>et al.</i> , (2016)
	Sonda CY5.5-TTGGCTCGTAGG+T+CGTT-BBQ	56 pb	ITS1	100	FM991956.1	

Tabla 4. Características de los cebadores y sondas para cada una de las especies de geohelmintos estudiadas

3.3.10.2. Protocolo de amplificación por PCR en tiempo real en formato simple para cada geohelminto.

La técnica de PCR en tiempo real para la detección de cada geohelminto de forma individual se realizó utilizando las condiciones propuestas por Llewellyn *et al.* (2016) con ligeras modificaciones (Llewellyn *et al.*, 2016). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L, usando 12,5 μ L de Quantimix Easy Probes 2X (Biotools laboratorios, Madrid, España) que contiene la enzima ADN polimerasa, los 4 dNTPs, $MgCl_2$ y el tampón de reacción. Se utilizaron las secuencias de oligonucleótidos para cada geohelminto a las concentraciones descritas en la **Tabla 4** y se añadió el ADN correspondiente en un volumen máximo de 5 μ L.

Se emplearon las condiciones de amplificación descritos por Llewellyn *et al.* (2016) para el diagnóstico de las geohelmintiasis: 15 minutos a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 9 segundos y 60 °C durante 60 segundos.

La amplificación y detección de fluorescencia fue llevada a cabo en un termociclador Corbett Rotor GeneTM 6000 real-time PCR system (Qiagen, Hilen, Alemania) y para el análisis de los datos se utilizó el programa Rotor Gene 6000 Series software versión 1.7. Se consideró una muestra positiva cuando se obtuvo un incremento significativo de fluorescencia por encima del umbral establecido para cada sonda.

En cada ensayo se utilizaron 4 controles: un blanco formado con la mezcla de todos los reactivos sin ADN, un control negativo perteneciente al ADN extraído de una muestra de heces de un donante sano (apartado 3.1.2.2. del presente capítulo), un control positivo conteniendo ADN genómico del parásito correspondiente y un control de inhibición añadiendo el ADN del geohelminto en estudio al ADN del control negativo. El análisis del ADN de las muestras de heces se realizó por duplicado incluyendo para cada muestra un tercer tubo como control de inhibición al que se añadió el ADN genómico del parásito correspondiente.

3.3.10.3. Protocolo de amplificación por PCR en tiempo real en formato múltiplex.

La técnica de PCR en tiempo real utilizando sondas de hibridación para la detección de los geohelmintos de forma conjunta en un mismo tubo se realizó utilizando las condiciones de amplificación descritas en el apartado anterior (3.3.8.2.). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ L, usando 12,5 μ L de Quantimix Easy Probes 2X (Biotools laboratorios, Madrid, España) que contiene la enzima ADN polimerasa, los 4 dNTPs, $MgCl_2$ y el tampón de reacción. Se utilizaron las secuencias de oligonucleótidos para cada geohelminto a las concentraciones descritas en la **Tabla 4** y se añadió el ADN correspondiente en un volumen máximo de 5 μ L.

La amplificación y detección de fluorescencia simultánea en todos los canales fue llevada a cabo en un termociclador Corbett Rotor Gene™ 6000 real-time PCR system (Qiagen, Hilden, Alemania) y para el análisis de los datos se utilizó el programa Rotor Gene 6000 Series software versión 1.7. Se consideró una muestra positiva cuando se obtuvo un incremento significativo de fluorescencia por encima del umbral establecido para cada sonda.

En cada ensayo se utilizaron los siguientes controles: un blanco formado con la mezcla de todos los reactivos sin ADN, un control negativo perteneciente al ADN extraído de una muestra de heces de un donante sano (apartado 3.1.2.2. del presente capítulo) y un control positivo formado por la mezcla de ADN genómico de cada parásito de estudio. El análisis del ADN de las muestras de heces se realizó por duplicado incluyendo un tercer tubo como control de inhibición para cada muestra al que se añadieron 1 ng de ADN de *S. venezuelensis*.

Los canales de fluorescencia del equipo, así como el espectro de absorción y emisión de los diferentes fluorocromos empleados en los protocolos de PCR, tanto en formato simple como múltiple, se muestran en la **Figura 4**.

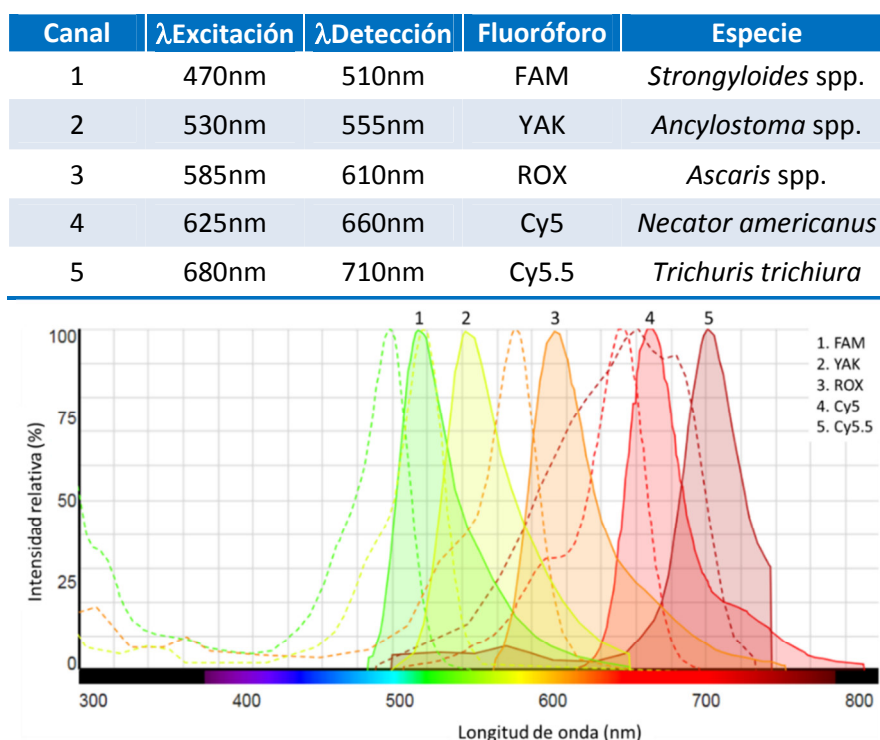


Figura 4. Canales del termociclador Corbett Rotor Gene™ 6000, espectro de absorción (líneas discontinuas) y emisión (líneas continuas) de los distintos fluorocromos de las sondas de hibridación.

3.3.11. Análisis estadístico

Para el cálculo de los *cut off* o puntos de corte de la técnica ELISA de subclases de isotipos IgG1 e IgG4 mediante curvas ROC se empleó el programa estadístico IBM® SPSS® Statistics Versión 18.

Para los análisis semi-cuantitativos del grado de relación entre técnicas se empleó la correlación de Pearson y su intervalo de confianza al 95% utilizando el programa R-studio versión 1.2.1335.

Los histogramas de distribución de frecuencias de variables continuas se realizaron mediante el programa SigmaPlot Version 10.0.

Para la comparación estadística de variables continuas cuya distribución no se ajustaba a una distribución normal se utilizó el test de Wilcoxon.

Para el análisis de los datos de forma cualitativa se construyeron tablas de contingencia 2 x 2 y se analizó la concordancia entre técnicas mediante el índice Kappa y su intervalo de confianza al 95% utilizando el programa R-studio versión 1.2.1335. Para la valoración del índice Kappa se utilizó la escala propuesta por [Landis y Koch en 1977](#). Según ésta, se considera ausencia de concordancia para índices de Kappa negativos; concordancia insignificante para índices entre 0,00 y 0,20; concordancia discreta entre 0,21 y 0,40; concordancia moderada entre 0,41 y 0,60; concordancia sustancial entre 0,61 y 0,80; y concordancia casi perfecta entre 0,81 y 1,00.

Para la comparación estadística de variables discretas se utilizó un análisis de chi-cuadrado.

Para la evaluación de la asociación de las distintas variables clínicas con la probabilidad de presentar un resultado positivo o negativo para una determinada técnica se calculó la probabilidad de *odds ratio* (POR) y su intervalo de confianza al 95% así como su valor de p asociado utilizando el programa R-studio versión 1.2.1335.

Con relación al análisis de los posibles factores de riesgo de padecer geohelmintiasis analizados mediante técnicas moleculares se calculó el valor de la probabilidad de riesgo relativo (PRR) y su intervalo de confianza al 95% así como su p-valor asociado utilizando el programa R-studio versión 1.2.1335.

En todos los análisis se consideró que existían diferencias significativas cuando el valor de *p* fue menor de 0,05 y se representaron con el símbolo *; diferencias muy

significativas cuando el valor de p fue menor de 0,01 y se representaron con el símbolo **; y altamente significativas cuando el valor de p fue menor de 0,001 y se representaron con el símbolo ***.



4. Resultados

4. Resultados

4.1. Diagnóstico serológico de estrongiloidiasis

4.1.1. Método ELISA “in house” para la detección de anticuerpos IgG1 e IgG4 frente a *Strongyloides* spp.

4.1.1.1. Estandarización de la concentración del antígeno y los reactivos del ensayo inmunoenzimático.

Una vez obtenido el antígeno a partir de larvas L3 de *S. venezuelensis*, de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 3.3.3.1. de Material y Métodos, se determinó su concentración de proteínas en 707,72 ng/μl mediante el método de BCA, según se indica en el mismo apartado.

La determinación de las concentraciones adecuadas de antígeno, así como las diluciones óptimas de suero y anticuerpo conjugado para el ensayo, se realizó siguiendo el formato de tablero de ajedrez tal y como aparece descrito en el capítulo 4 (*Titration of Reagents*) de *The ELISA Guidebook* (Crowther, 2000) y empleando un *pool* de 10 sueros positivos categorizados dentro del grupo 2 y un *pool* de 10 sueros negativos incluidos en el grupo 4 definidos en el apartado 3.1.2.1. de Material y Métodos.

Para la titulación del antígeno se enfrentaron diferentes concentraciones de éste (10; 7,5; 5; 2,5; 1,25 ng/μl) a diluciones seriadas de los *pools* de sueros positivos (columnas 1-6) y negativos (columnas 7-12) desde la dilución 1/25 hasta la 1/1600, manteniéndose constante la dilución del anticuerpo conjugado (1/4000) tanto para el ensayo de IgG1 como de IgG4. Se empleó la última de las filas (fila H) como blanco de reacción, sin suero, y tanto la columna 6 como la 12 no fueron sensibilizadas con el antígeno (**Figura 5**).

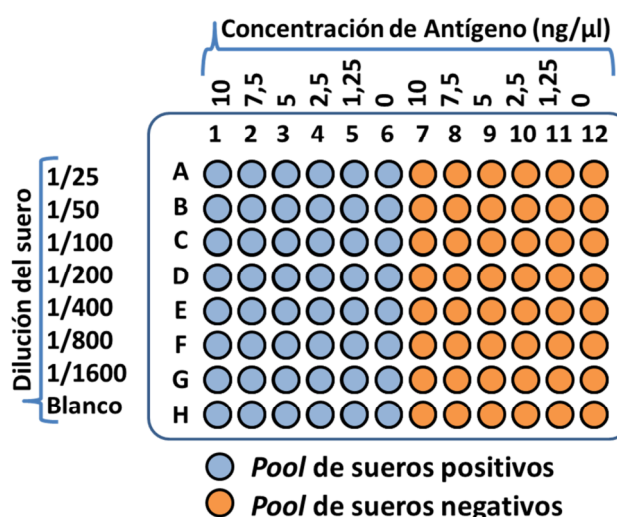


Figura 5. Esquema de las placas de ELISA utilizado para el ensayo de titulación de la concentración de antígeno y el rango de la dilución de los *pools* de sueros positivos y negativos.

Los ensayos se llevaron a cabo siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.3.2. de Material y Métodos.

A partir de las absorbancias obtenidas para cada uno de los pocillos en ambas placas se determinó el Ratio de Unión (RU= Absorbancia positivos/Absorbancia negativos), el cual nos permitió seleccionar la concentración del antígeno adecuada y el rango de dilución del suero (**Tablas 5 y 6**).

		Concentración en ng/μl					
		10	8	5	3	1	0
Dilución del pool de sueros	1/25	1.846	2.157	2.043	2.076	1.858	1.412
	1/50	1.725	2.364	2.070	2.000	1.698	1.519
	1/100	1.758	1.840	1.862	1.835	1.583	1.394
	1/200	1.486	1.815	1.972	1.867	1.537	1.542
	1/400	1.348	1.493	1.588	1.534	1.412	1.074
	1/800	1.351	1.338	1.519	1.373	1.261	1.047
	1/1600	1.250	1.226	1.217	1.457	1.229	1.094
	0	0.904	1.064	0.933	0.786	0.861	0.838

Tabla 5. Valores del Ratio de Unión (RU) de la titulación del antígeno en el ensayo de detección de IgG1.

		Concentración en ng/μl					
		10	8	5	3	1	0
Dilución del pool de sueros	1/25	17.098	14.328	14.511	7.065	4.527	1.816
	1/50	12.614	10.596	9.478	7.140	4.022	1.295
	1/100	7.250	6.000	5.353	4.600	3.184	1.244
	1/200	5.186	4.711	3.975	3.780	1.857	1.081
	1/400	3.558	2.722	2.737	1.927	1.658	1.188
	1/800	3.053	2.275	2.026	1.553	1.184	1.188
	1/1600	2.286	1.978	1.196	1.075	1.086	0.813
	0	1.822	1.654	0.962	0.975	1.194	1.069

Tabla 6. Valores del Ratio de Unión (RU) de la titulación del antígeno en el ensayo de detección de IgG4.

Para los ensayos de detección de IgG1 y de IgG4, se seleccionó como el mejor RU el obtenido utilizando el antígeno a una concentración de 5 ng/μl, encontrando el mejor rango de las diluciones de los *pools* de los sueros positivos y negativos entre las diluciones 1/25 y

1/200, ya que proporcionaban el valor más alto de RU sin la necesidad de emplear una mayor cantidad de antígeno (**Tablas 5 y 6**).

A continuación, se realizó la titulación del suero y del anticuerpo conjugado (**Figura 6**). En este caso se emplearon de nuevo dos placas, una para el conjugado anti-IgG1 y otra para anti-IgG4, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.3.2. de Material y Métodos.

Se mantuvo constante la concentración del antígeno seleccionada previamente (5 ng/ μ l) y se realizaron diluciones de los *pools* de sueros positivos y negativos dentro del siguiente rango: 1/12,5; 1/25; 1/50; 1/75; 1/100; 1/150 y 1/200. Las diluciones empleadas del anticuerpo conjugado para la detección de IgG1 e IgG4 fueron: 1/1000; 1/2000; 1/4000; 1/6000 y 1/8000. Se utilizó la última de las filas (fila H) como blanco de reacción (sin suero) y en las columnas 6 y 12 no se dispensó anticuerpo conjugado.

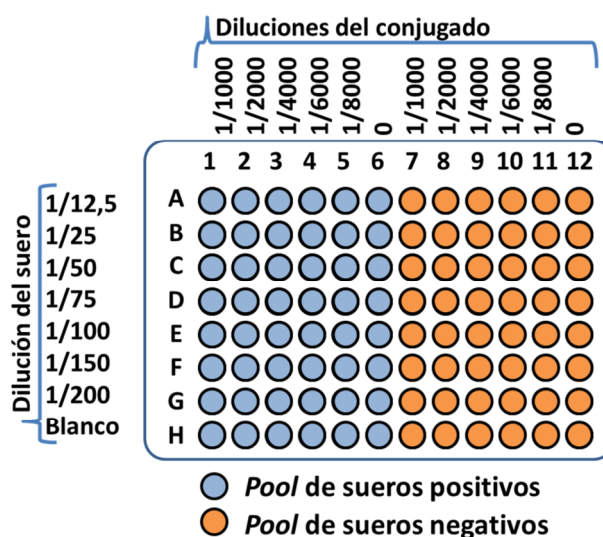


Figura 6. Esquema de las placas de ELISA utilizado para el ensayo de titulación de la dilución del suero y anticuerpo conjugado para la detección de IgG1 e IgG4.

Una vez medidas las absorbancias se determinó el RU para seleccionar la dilución óptima de trabajo del suero y de los anticuerpos conjugados (IgG1 e IgG4), tal como se muestra en las **Tablas 7 y 8**.

		Dilución del conjugado anti-IgG1					
		1/1000	1/2000	1/4000	1/6000	1/8000	0
Dilución del pool de sueros	1/12,5	7,738	11,49	13,151	15,588	15,271	0,955
	1/25	7,678	10,93	13,17	14	14,533	0,84
	1/50	6,215	7,871	10,082	10,243	10,655	0,778
	1/75	4,831	7,981	7,489	9,407	7,231	0,69
	1/100	4,45	4,993	6,443	6,889	7,6	0,87
	1/150	3,116	5,629	5,765	6,264	5,694	0,87
	1/200	3,305	4,071	5,115	4,698	4,933	0,952
	0	0,704	1,124	0,981	0,939	1	0,76

Tabla 7. Valores de Ratio de Unión (RU) de la titulación de los *pools* de las muestras de suero (positivas y negativas) y del anticuerpo conjugado en el ensayo de detección de IgG1.

		Dilución del conjugado anti-IgG4					
		1/1000	1/2000	1/4000	1/6000	1/8000	0
Dilución del pool de sueros	1/12,5	12,043	13,167	14,300	14,051	14,182	1,000
	1/25	8,987	13,258	12,859	14,279	14,423	0,957
	1/50	7,319	10,744	10,881	10,695	11,354	2,913
	1/75	6,975	7,731	9,847	8,649	9,295	1,000
	1/100	4,574	7,395	7,852	7,423	7,881	0,917
	1/150	4,309	5,605	7,040	5,281	6,421	0,955
	1/200	3,737	2,017	5,185	4,615	4,614	1,045
0		0,847	0,196	0,833	1,143	1,105	1,000

Tabla 8. Valores de Ratio de Unión (RU) de la titulación de los *pools* de las muestras de suero (positivas y negativas) y del anticuerpo conjugado en el ensayo de detección de IgG4.

El valor de RU escogido fue el de 10,082 para el ensayo de ELISA-IgG1 y de 10,881 para el ensayo de ELISA-IgG4 ya que en ambos casos además de ser uno de los valores más elevados son los más coincidentes en las mismas condiciones. Así, las diluciones seleccionadas para la detección de IgG1 e IgG4 fueron de 1/50 para el suero y de 1/4000 para el anticuerpo conjugado (**Tablas 7 y 8**).

4.1.1.2. Establecimiento de los valores de punto de corte o *cut off* (C.O.)

Para el establecimiento de los valores de *cut off* (C.O.) en cada uno de los ensayos de detección de IgG1 e IgG4 se analizaron los valores de sensibilidad y especificidad mediante curvas ROC. Se siguió el protocolo descrito en el apartado 3.3.3.3. de Material y Métodos, manteniendo las condiciones establecidas de concentración de antígeno y dilución de los sueros y anticuerpo conjugado descritas anteriormente, y utilizando 10 sueros de individuos previamente categorizados como verdaderos positivos (grupo 1 del apartado 3.1.2.1.) y 20 negativos (grupo 4 del apartado 3.1.2.1), permitiéndonos seleccionar el C.O. que nos proporcionó unos mejores valores de sensibilidad y especificidad.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 9**. Se establecieron unos valores de C.O. de 0,267 para la técnica ELISA de detección de IgG1 y de 0,120 para la de IgG4, primando la mejor relación entre sensibilidad y especificidad.

IgG1			IgG4		
Valor de C.O.	Sensibilidad	1-Especificidad	Valor de C.O.	Sensibilidad	1-Especificidad
-0,95200	1,000	1,000	-0,95000	1,000	1,000
0,05150	1,000	0,950	0,05300	1,000	0,950
0,05550	1,000	0,850	0,05700	1,000	0,900
0,05650	1,000	0,800	0,05900	1,000	0,800
0,05750	1,000	0,750	0,06050	1,000	0,750
0,05850	1,000	0,700	0,06300	1,000	0,700
0,06100	1,000	0,650	0,06550	1,000	0,650
0,06350	1,000	0,600	0,06650	1,000	0,600
0,06800	1,000	0,550	0,06800	1,000	0,550
0,07300	1,000	0,450	0,07000	1,000	0,450
0,07500	1,000	0,400	0,07300	1,000	0,400
0,08000	1,000	0,350	0,07550	1,000	0,350
0,08500	1,000	0,300	0,07700	1,000	0,300
0,08950	1,000	0,200	0,08500	1,000	0,200
0,09600	1,000	0,150	0,11950	1,000	0,150
0,11000	1,000	0,100	0,16150	1,000	0,100
0,13450	1,000	0,050	0,23400	1,000	0,050
0,26650	1,000	0,000	0,31400	1,000	0,000
0,39300	0,900	0,000	0,35500	0,900	0,000
0,42150	0,800	0,000	0,44600	0,800	0,000
0,46300	0,700	0,000	0,56150	0,700	0,000
0,50300	0,600	0,000	0,94950	0,600	0,000
0,57650	0,500	0,000	147,600	0,500	0,000
0,64250	0,400	0,000	232,900	0,400	0,000
0,87450	0,300	0,000	400,000	0,300	0,000
115,300	0,200	0,000			
137,600	0,100	0,000			
254,100	0,000	0,000			

Tabla 9. Valores de *cut off* para los ensayos de ELISA-IgG1 e IgG4 para cada par de sensibilidad/(1-especificidad).

4.1.2. Evaluación de la técnica ELISA en muestras clínicas de sueros de pacientes inmigrantes o viajeros con sospecha de padecer estrongiloidiasis.

Una vez estandarizadas las condiciones de trabajo para la detección de IgG1 e IgG4 frente a *Strongyloides* spp. por ELISA se llevó a cabo la evaluación de los ensayos en las muestras de suero correspondientes a los pacientes reclutados entre julio de 2014 y mayo de

2017 en 6 hospitales del SNS que aparecen recogidas en el apartado 3.1.2.1. de Material y Métodos.

Se reclutaron 182 pacientes: 6 expatriados (con más de un año de estancia en zona endémica), 167 inmigrantes y 9 autóctonos. De los 182 pacientes, 37 fueron reclutados en el Hospital de Poniente-El Ejido (Almería), 31 en el Hospital Universitario Vall d'Hebrón (Barcelona), 61 en el Hospital Universitario Clínic (Barcelona), 32 en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona), 11 en el Hospital del Mar (Barcelona) y 10 en el Hospital Universitario de Bellvitge (Barcelona). La información epidemiológica, clínica y analítica de cada paciente fue recogida en una ficha/cuestionario común para los seis hospitales que participaron en el estudio (**Anexo 1**).

El diagrama de los pacientes y muestras obtenidas de los mismos para cada ensayo diagnóstico se muestra a continuación (**Figura 7**).

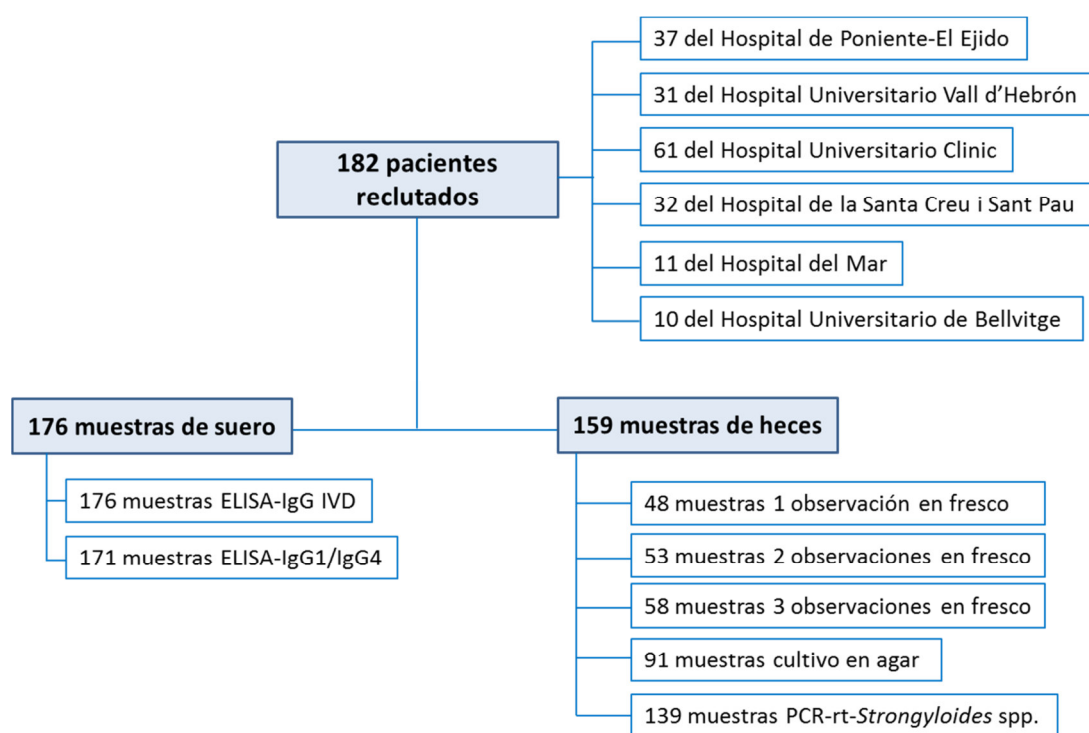


Figura 7. Diagrama de los pacientes reclutados y las muestras obtenidas de los mismos para cada prueba diagnóstica.

De todos los pacientes reclutados, 95 fueron mujeres y 87 hombres. La edad de los pacientes se encontró entre 16 y 75 años, con una media de 40,24 y una mediana de 38,35. De los 6 expatriados, 5 eran españoles y 1 portugués. El país de origen de los 167 pacientes

inmigrantes aparece reflejado en la **Figura 8**, donde podemos ver que la gran mayoría, un 71,52%, procedió del continente americano, siendo el país más frecuente Bolivia (53,39%) seguido de Ecuador (17,80%). Los africanos representaron un 27,27% del total de pacientes inmigrantes, siendo un 26,67% de ellos de Guinea Ecuatorial y un 22,22% de Guinea Bissau. El porcentaje de inmigrantes procedente de Europa tan sólo supuso un 1% de la población en estudio.

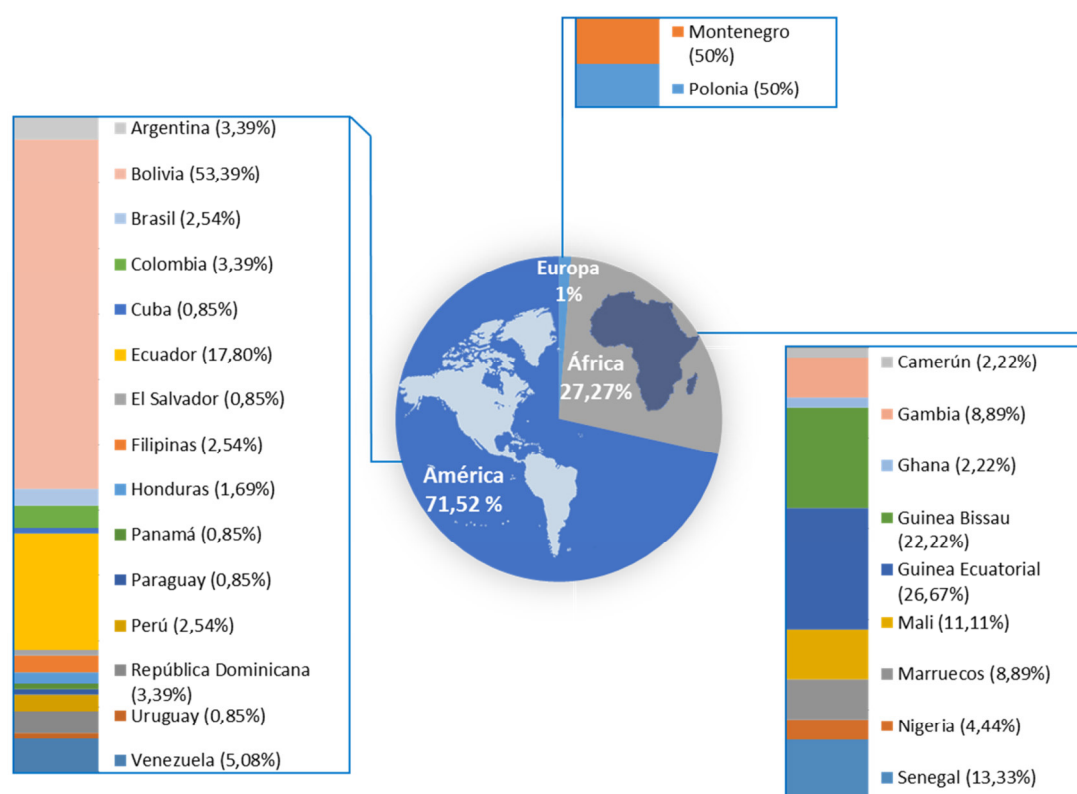


Figura 8. Origen geográfico de los pacientes inmigrantes incluidos en el estudio.

De las 95 mujeres, 2 estaban embarazadas, encontrándose una en el primer trimestre de gestación y otra en el segundo; 66 no lo estaban y en 27 no se dispuso de ese dato. En cuanto a los antecedentes patológicos, 49 de los 182 pacientes analizados se encontraban inmunodeprimidos. En referencia a los resultados de serología frente al virus HTLV-1, sólo hubo dos pacientes que fueron positivos, 70 negativos y del resto no se dispuso de datos. Los antecedentes clínico-analíticos referidos por los pacientes en el último año y recogidos en los hospitales participantes, aparecen representados en las **Figuras 9 a 14**. En la evaluación de los criterios clínicos se consideró que un paciente presentaba eosinofilia cuando el recuento fue mayor de 500 eosinófilos/ μ L y que el valor de la IgE estaba elevado cuando éste fue superior a 500 U/ml.

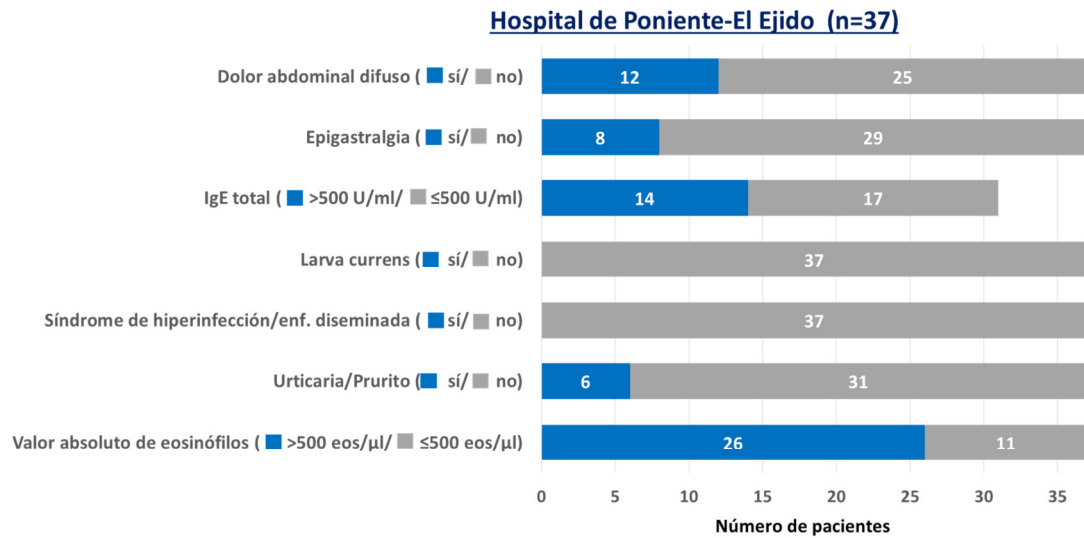


Figura 9. Antecedentes clínico-analíticos de los pacientes atendidos en el Hospital de Poniente- El Ejido (Almería).

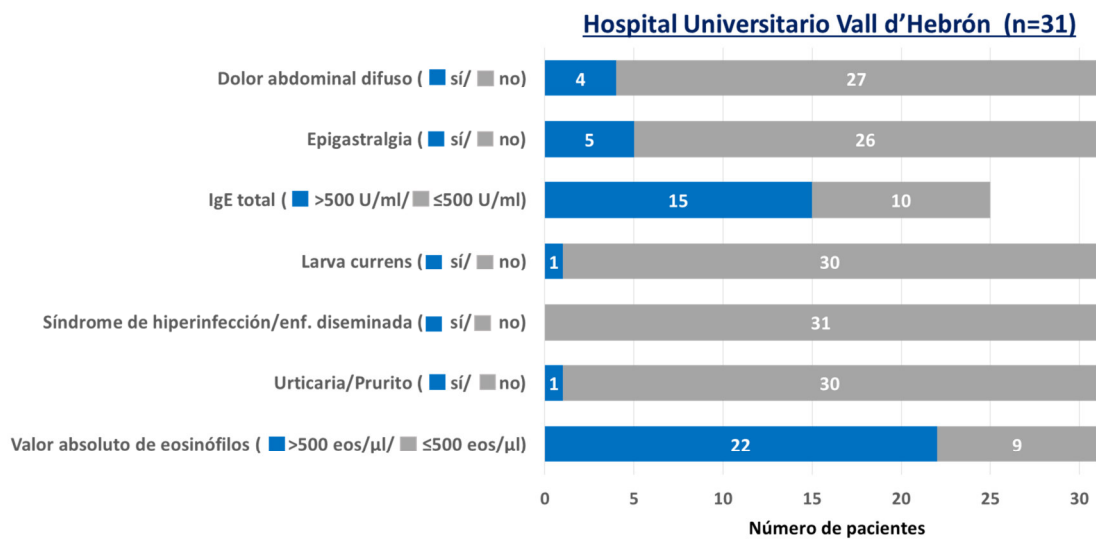


Figura 10. Antecedentes clínico-analíticos de los pacientes atendidos en el Hospital Universitario Vall d'Hebrón (Barcelona).

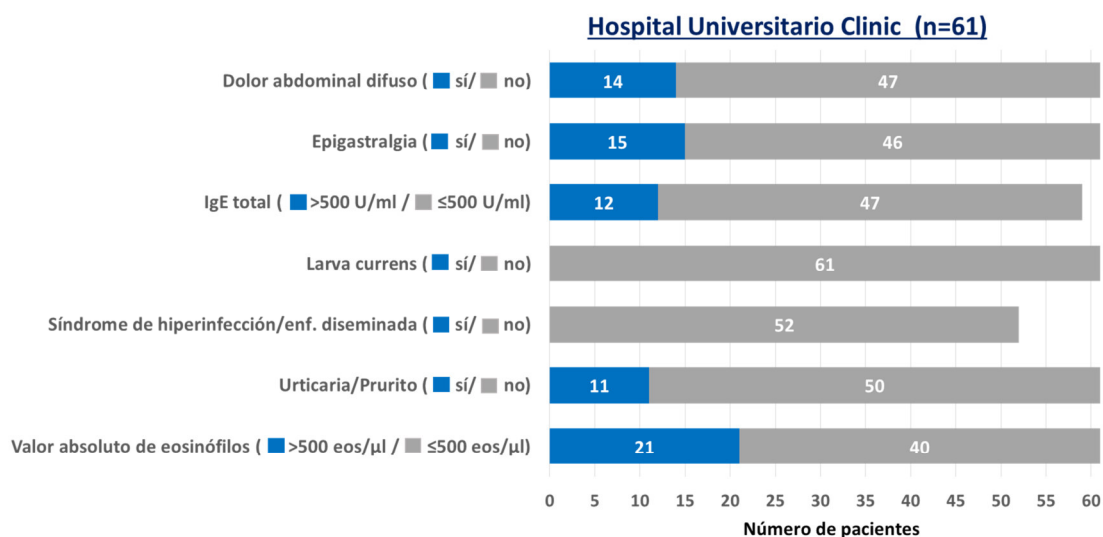


Figura 11. Antecedentes clínico-analíticos de los pacientes atendidos en el Hospital Universitario Clínic (Barcelona).

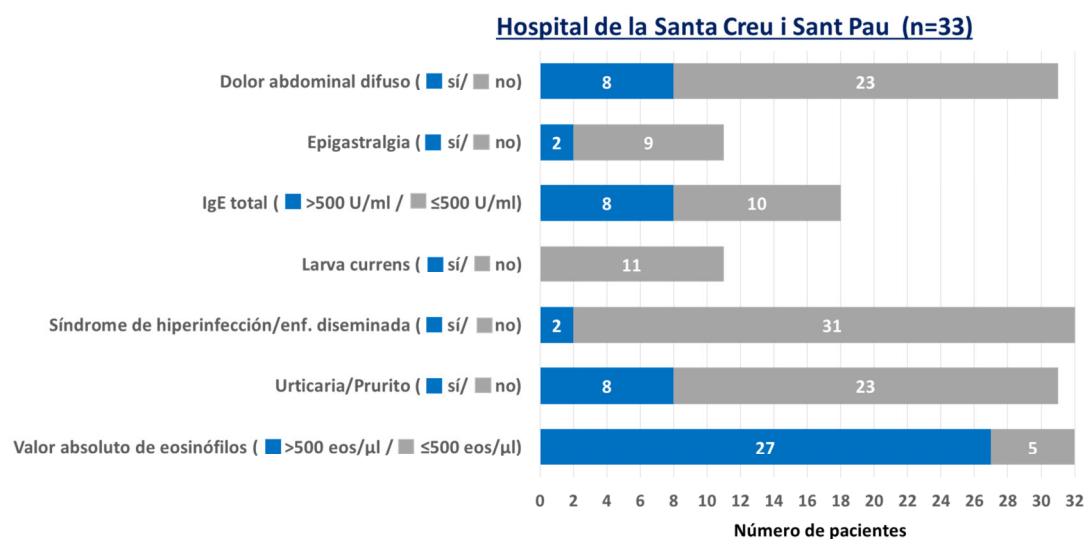


Figura 12. Antecedentes clínico-analíticos de los pacientes atendidos en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona).

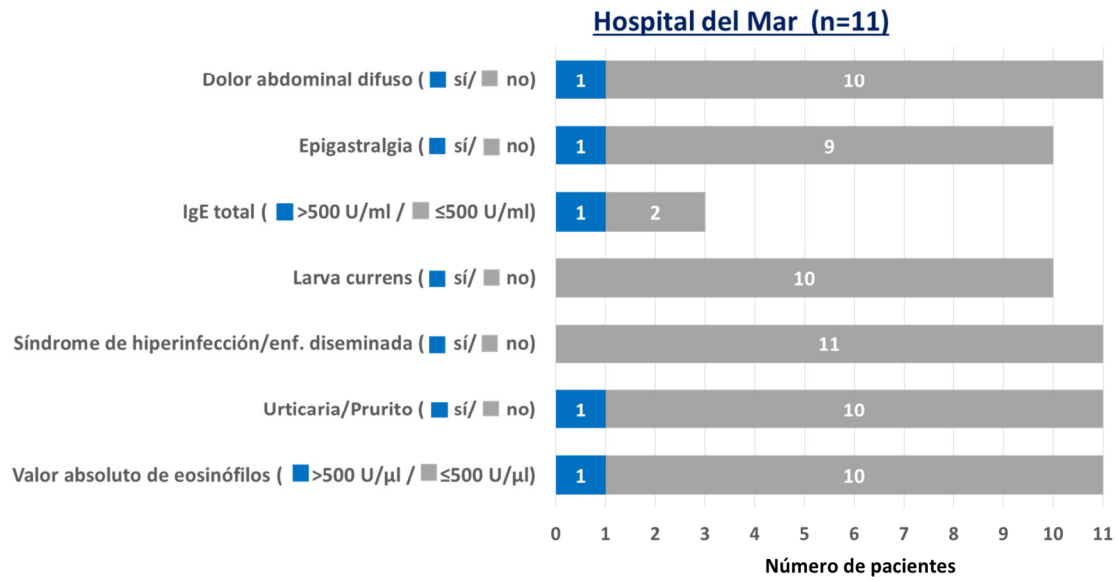


Figura 13. Antecedentes clínico-analíticos de los pacientes atendidos en el Hospital del Mar (Barcelona).

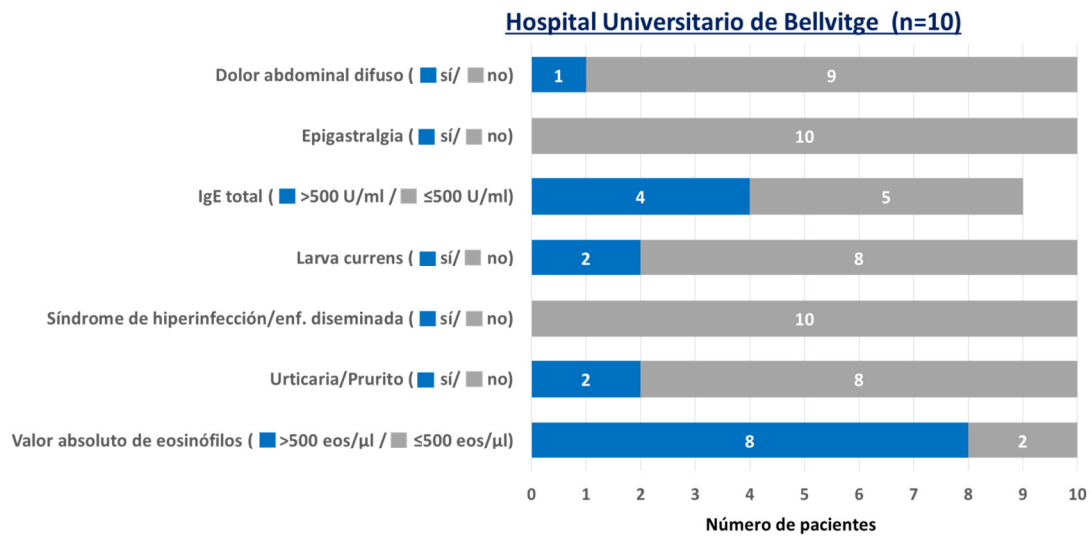


Figura 14. Antecedentes clínico-analíticos de los pacientes atendidos en el Hospital Universitario de Bellvitge (Barcelona).

Los resultados serológicos para el diagnóstico de *Strongyloides* spp. se obtuvieron tras realizar las técnicas de ELISA comercial por el kit IgG ELISA IVD y de ELISA “in house” para la detección de IgG1 e IgG4 (apartados 3.3.2. y 3.3.3. de Material y Métodos). Del total de los 182 pacientes incluidos en el estudio se dispuso de 176 muestras de suero para realizar la técnica ELISA-IgG IVD y de 171 para la determinación de ELISA-IgG1 e IgG4 (**Figura 7**). De las 176 muestras de suero analizadas por ELISA-IgG IVD, 169 fueron positivas, 5 negativas y 2 indeterminadas. De las 171 muestras de suero empleadas para la detección de IgG1 e IgG4 por ELISA, 30 fueron positivas sólo para la técnica de ELISA-IgG1, 16 para ELISA-IgG4 y 32 fueron positivos a ambas subclases. Destacando que 78 muestras fueron positivas al menos para una de las dos subclases (IgG1 y/o IgG4).

Con el fin de evaluar la concordancia existente entre los valores de los índices obtenidos por las diferentes técnicas de ELISA se analizaron estos resultados de forma semicuantitativa utilizando la correlación de Pearson (apartado 3.3.1.1. de Material y Métodos). La correlación entre los resultados obtenidos por el ELISA-IgG IVD y ELISA-IgG1 fue de 0,51 con un intervalo de confianza del 95% de 0,39 a 0,62, mientras que la obtenida entre el ELISA-IgG IVD y el ELISA-IgG4 fue menor, de 0,32 con un intervalo de 0,17 a 0,45. La correlación entre ambas subclases, ELISA-IgG1 e IgG4, fue de 0,42 con un intervalo de 0,28 a 0,53.

Se representó gráficamente la distribución de los valores de los índices obtenidos con las distintas técnicas empleadas mediante diagramas de cajas y se compararon los resultados mediante el test de Wilcoxon, ya que la distribución de los valores no se ajustaba a una distribución normal. En primer lugar se compararon los valores de índice obtenidos por ELISA-IgG IVD en el total de pacientes analizados y en aquellos positivos y negativos por el ELISA de subclases (ELISA-IgG1 y/o IgG4) (**Figura 15**). Tras estos análisis se observó que existían diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre los valores de los índices por ELISA-IgG IVD en el total de los pacientes y los valores de ELISA-IgG IVD de los pacientes positivos por el ELISA de subclases (IgG1 y/o IgG4), así como entre los valores de los índices por ELISA-IgG IVD del total de los pacientes y los valores de ELISA-IgG IVD de los pacientes negativos por el ELISA de subclases (IgG1 y/o IgG4). Además, también se observaron diferencias altamente significativas en los valores de ELISA-IgG IVD de los pacientes positivos y negativos por el ELISA de subclases (**Figura 16**).

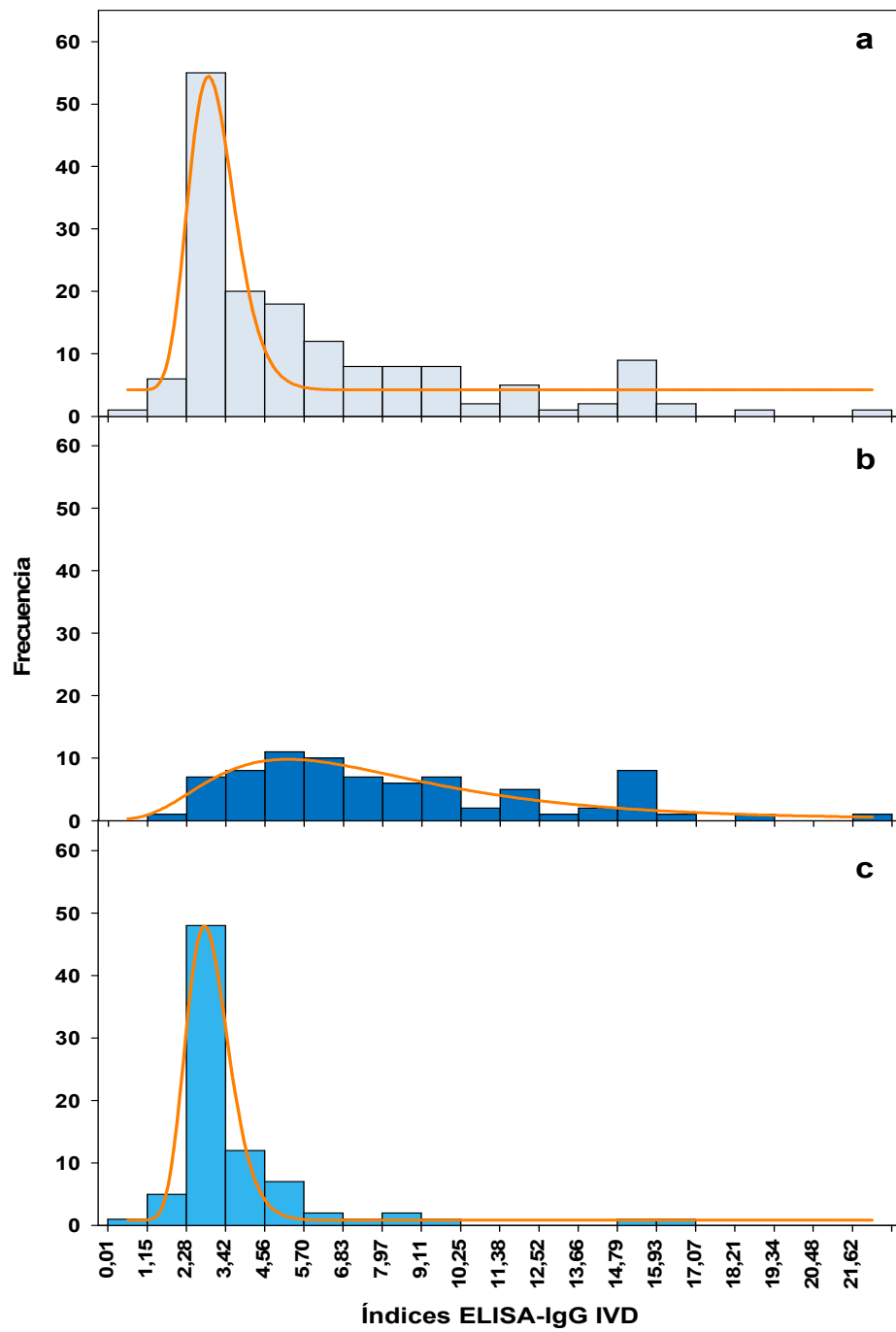


Figura 15. Distribución de los valores de índice obtenidos por ELISA-IgG IVD en: **a.** Todos los pacientes estudiados; **b.** Pacientes con serología de subclases (IgG1 y/o IgG4) positiva; **c.** Pacientes con serología de subclases (IgG1 y/o IgG4) negativa.

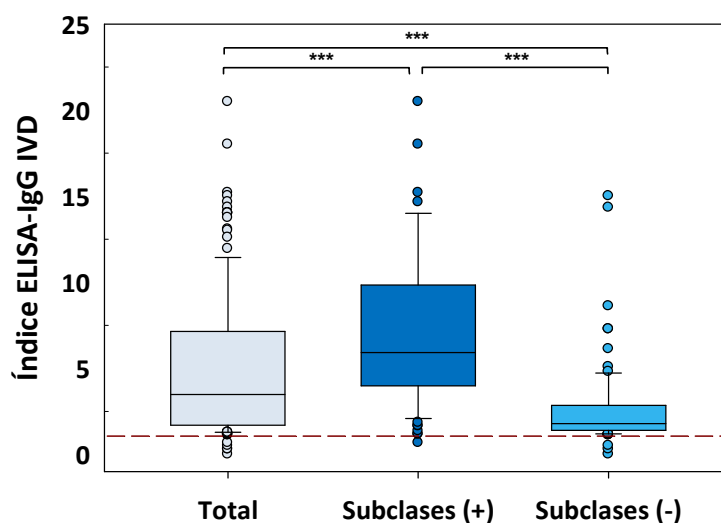


Figura 16. Diagrama de cajas de los valores de índice obtenidos por ELISA-IgG IVD en todos los pacientes estudiados de forma conjunta y en los pacientes positivos y negativos por el ELISA de subclases (IgG1 y/o IgG4). *** $p < 0,001$.

Debido a esta elevada diferencia estadística entre los resultados de los índices serológicos anteriores, se compararon los valores de los índices obtenidos para ELISA-IgG IVD con los obtenidos para cada subclase de forma individual. Con referencia a los resultados de los valores de índice del ensayo ELISA-IgG IVD para el total de los pacientes y los positivos y negativos para la técnica ELISA-IgG1, se observaron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre los valores de ELISA-IgG IVD del total de pacientes y los que presentaron índices positivos para ELISA-IgG1, así como entre los valores por ELISA-IgG IVD de los pacientes positivos y negativos para la técnica ELISA-IgG1. La comparación entre los valores de ELISA-IgG IVD del total de pacientes y los valores de los pacientes negativos para ELISA-IgG1 resultó ser muy significativa ($p < 0,01$) (**Figuras 17 y 18**).

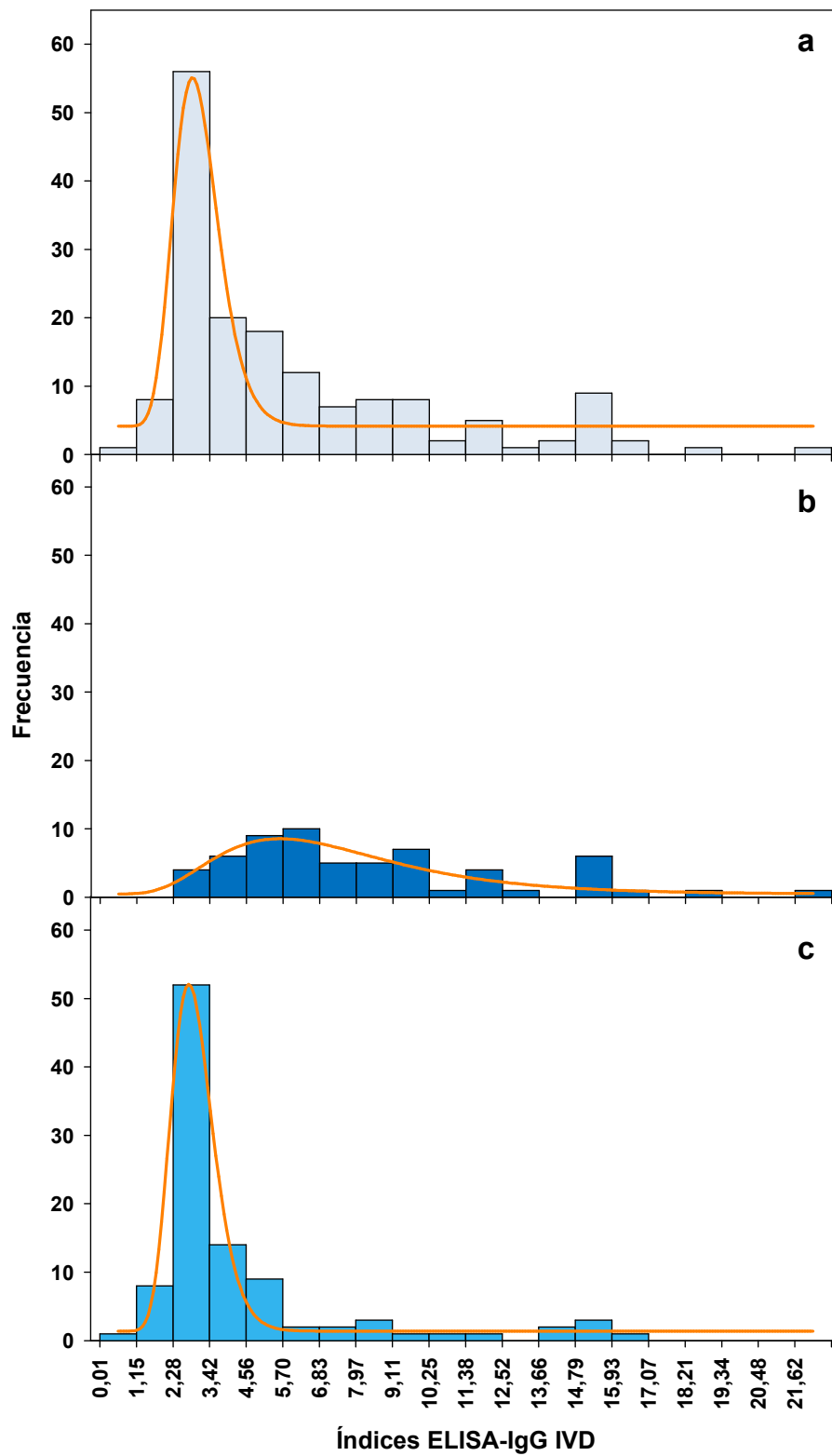


Figura 17. Distribución de los valores de índice obtenidos por ELISA-IgG IVD en: **a.** Todos los pacientes estudiados; **b.** Pacientes positivos para ELISA-IgG1; **c.** Pacientes negativos para ELISA-IgG1.

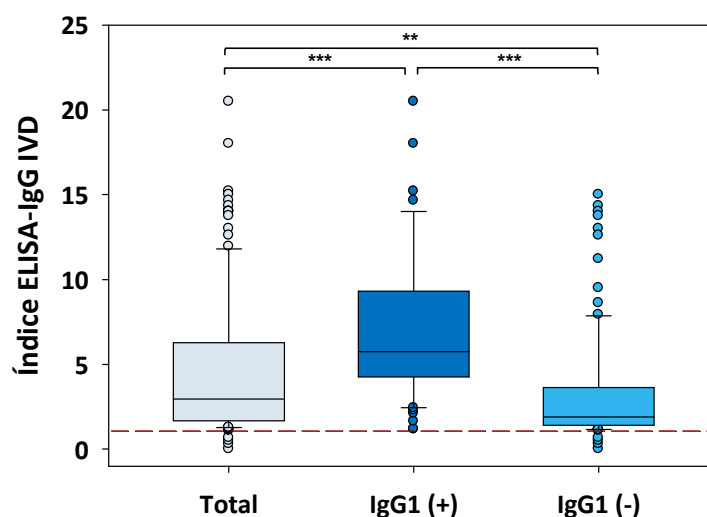


Figura 18. Diagrama de cajas de los valores de índice obtenidos por ELISA-IgG IVD en todos los pacientes estudiados de forma conjunta y en los pacientes positivos y negativos a ELISA-IgG1. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

En relación a los resultados de los valores de índice del ensayo ELISA-IgG IVD, para el total de los pacientes y los positivos y negativos para la técnica ELISA-IgG4 también se observaron diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre los valores de ELISA-IgG IVD del total de pacientes y los que presentaron los pacientes positivos para ELISA-IgG4, así como entre los valores de ELISA-IgG IVD de los pacientes positivos y negativos para la técnica ELISA-IgG4. La comparación entre los valores de ELISA-IgG IVD del total de pacientes y los valores de los pacientes negativos para ELISA-IgG4 resultó ser muy significativa ($p < 0,01$) (**Figuras 19 y 20**).

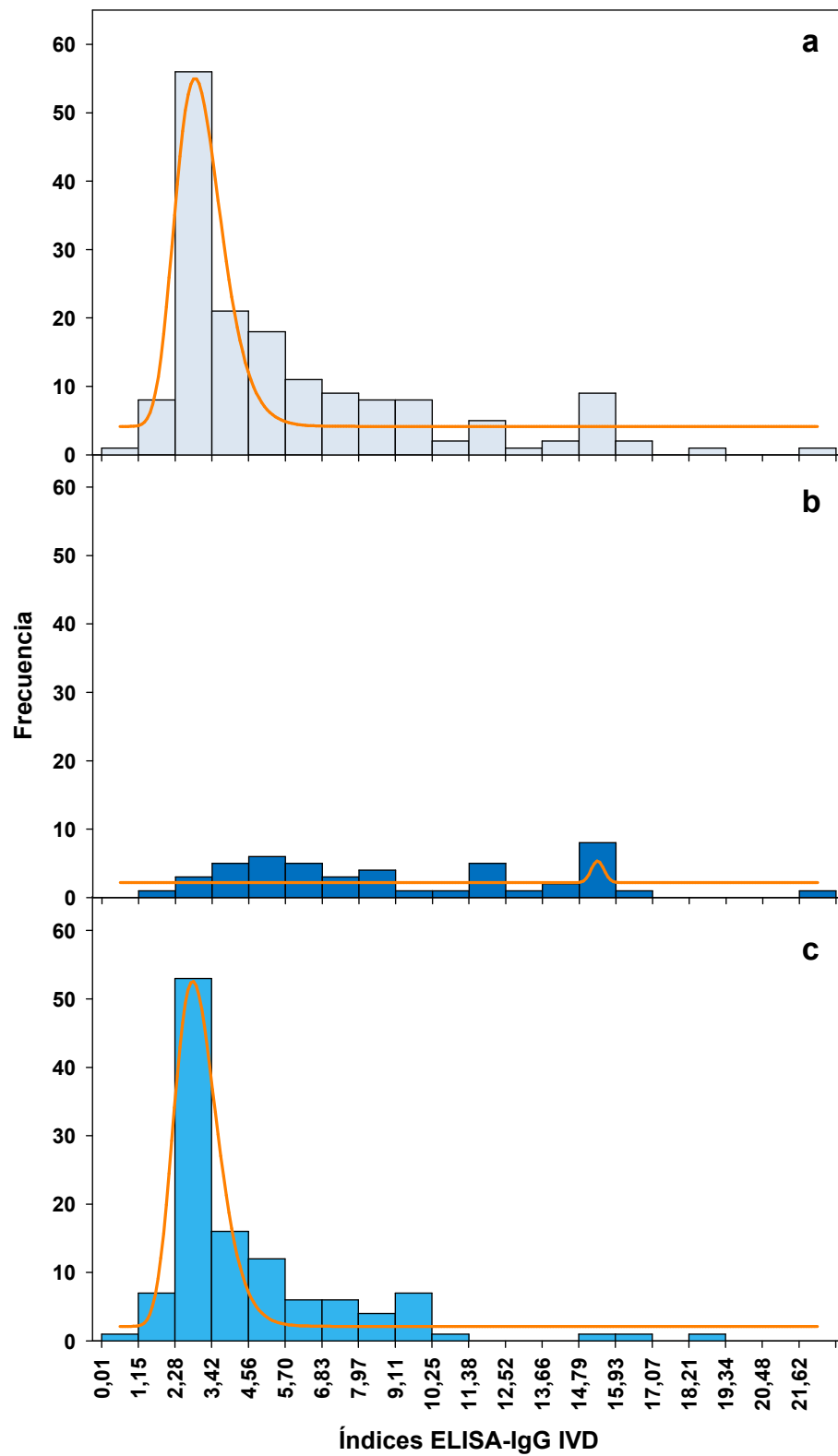


Figura 19. Distribución de los valores de índice obtenidos por ELISA-IgG IVD en: **a.** Todos los pacientes estudiados; **b.** Pacientes positivos para ELISA-IgG4; **c.** Pacientes negativos para ELISA-IgG4.

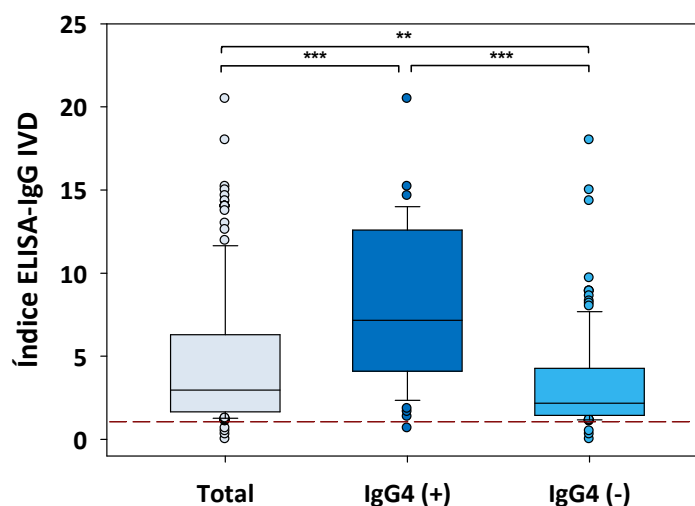


Figura 20. Diagrama de cajas de los valores de índice obtenidos por ELISA-IgG IVD en todos los pacientes estudiados de forma conjunta y en los pacientes positivos y negativos a ELISA-IgG4. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Además, tratamos de comparar los resultados serológicos con los métodos directos. En relación a los resultados de la observación microscópica directa, a partir del análisis en fresco de 1, 2 o 3 muestras de heces de los 159 pacientes, tras realizar en 48 pacientes el análisis en fresco de una única muestra, 10 de éstos resultaron positivos. El análisis de dos muestras pudo realizarse en 53 pacientes, de los cuales 10 fueron positivos y tres muestras de heces se consiguieron analizar en 58 pacientes, obteniéndose 8 positivos (**Figura 7**).

La técnica de cultivo en agar se pudo realizar en 91 de los 159 pacientes (**Figura 7**) que proporcionaron muestra de heces, obteniéndose en 30 de ellos un resultado positivo para *Strongyloides* spp. y en 61 un resultado negativo.

En 139 de los 159 pacientes se dispuso de muestras de heces para realizar la técnica PCR-rt-*Strongyloides* spp. (**Figura 7**) (apartado 3.3.9. de Material y Métodos), detectándose 62 pacientes positivos. Debido a que por la técnica PCR-rt-*Strongyloides* spp. se detectaron todos los casos positivos obtenidos por las técnicas parasitológicas convencionales, se analizaron los resultados obtenidos por ELISA-IgG IVD en pacientes positivos y negativos para la técnica PCR-rt-*Strongyloides* spp. (**Figura 21**), observándose que no existían diferencias significativas entre estos resultados (**Figura 22**).

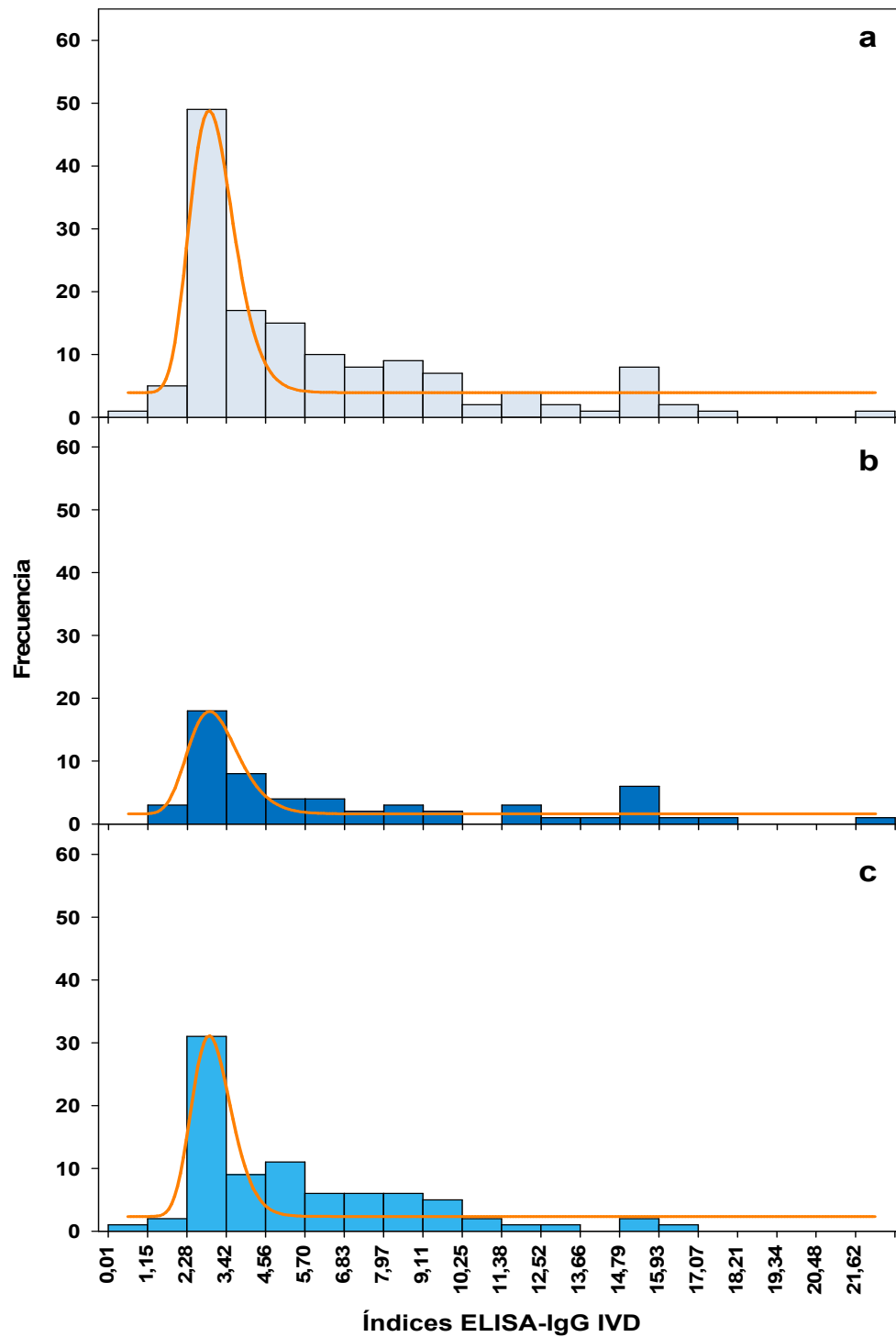


Figura 21. Distribución de los valores de índice obtenidos por ELISA-IgG IVD en: **a.** Todos los pacientes estudiados; **b.** Pacientes con PCR-rt-*Strongyloides* spp. positiva; **c.** Pacientes con PCR-rt-*Strongyloides* spp. negativa.

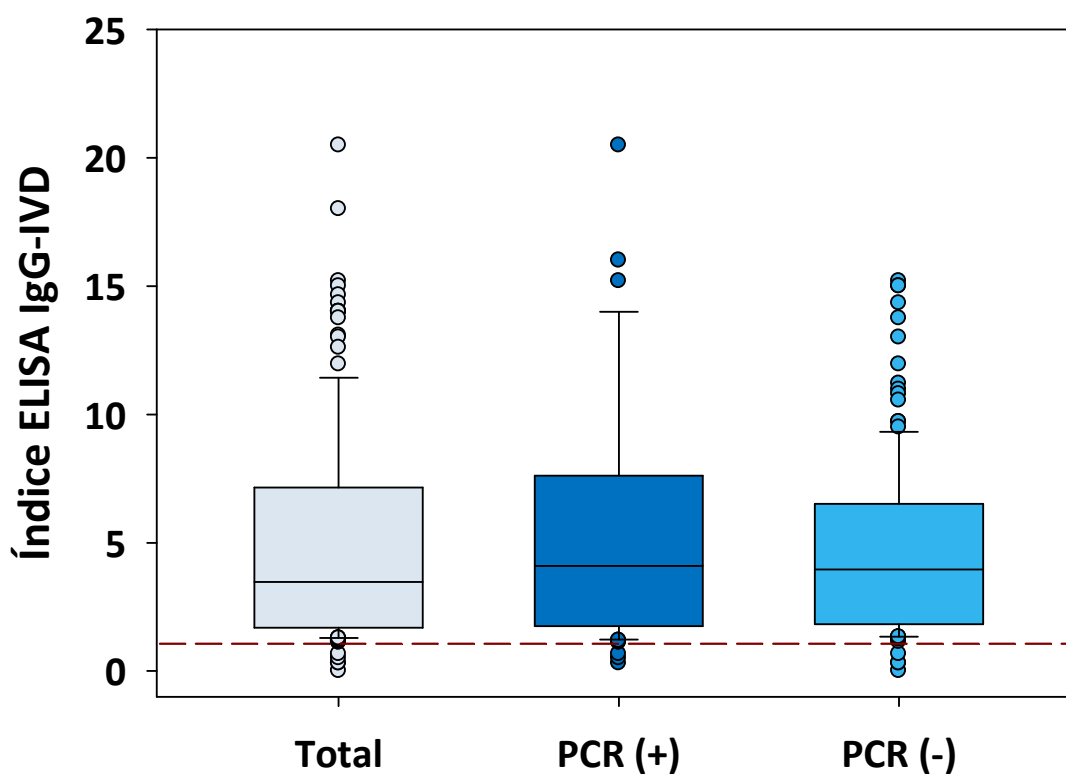


Figura 22. Diagrama de cajas de los valores de índice obtenidos por ELISA-IgG IVD en todos los pacientes estudiados de forma conjunta y en los pacientes positivos y negativos por PCR-rt-*Strongyloides* spp.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el estudio de los índices obtenidos para la técnica ELISA-IgG1 en el total de pacientes estudiados y los que presentaron los pacientes positivos y negativos por la técnica de PCR-rt-*Strongyloides* spp. (Figuras 23 y 24).

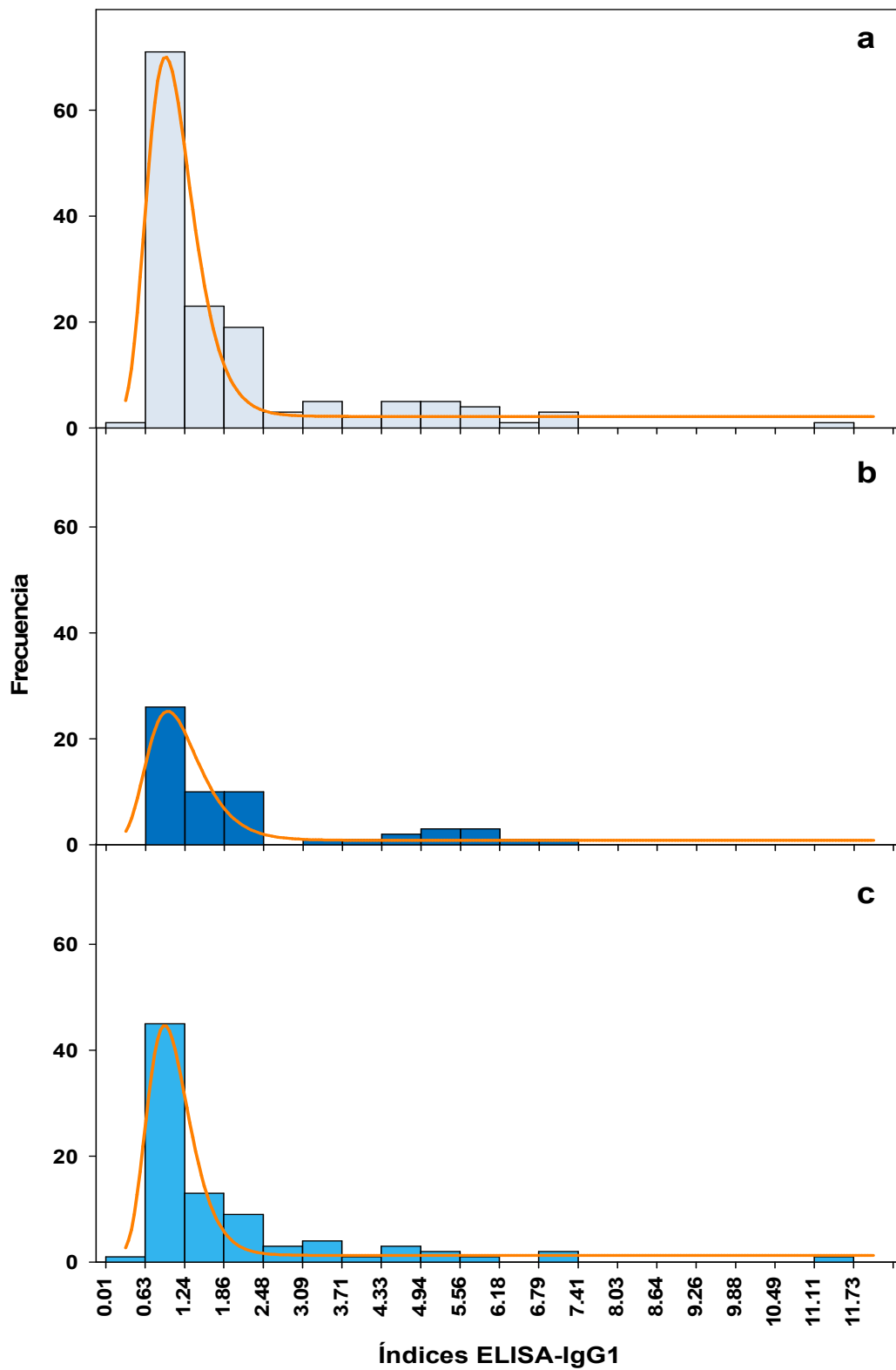


Figura 23. Distribución de los valores de índice para ELISA-IgG1 en: **a.** Todos los pacientes estudiados; **b.** Pacientes con PCR- *rt-Strongyloides* spp. positiva; **c.** Pacientes con PCR-*rt-Strongyloides* spp. negativa.

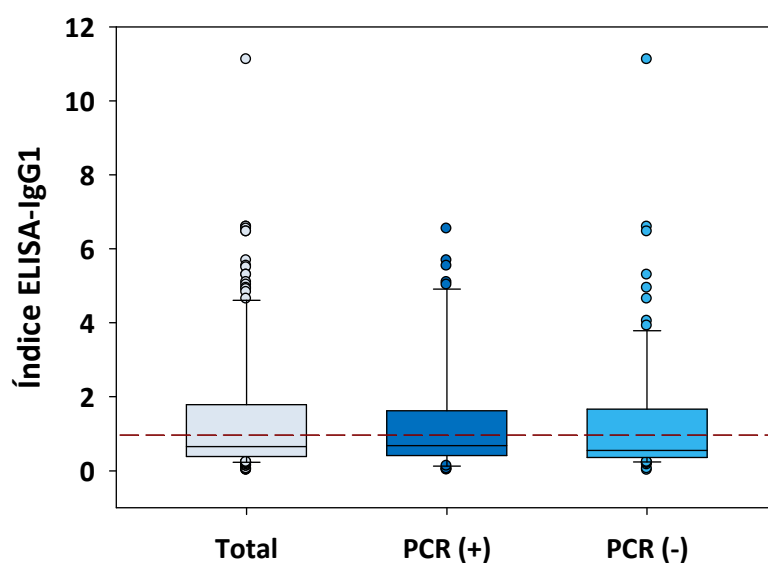


Figura 24. Diagrama de caja para los resultados de índice por ELISA-IgG1 en todos los pacientes estudiados de forma conjunta y en los positivos y negativos para PCR-rt-*Strongyloides* spp.

Del mismo modo, no se observaron diferencias significativas entre los valores de índice de ELISA-IgG4 para el total de los pacientes estudiados y los que presentaron los pacientes positivos y negativos por la técnica de PCR-rt-*Strongyloides* spp. (**Figuras 25 y 26**).

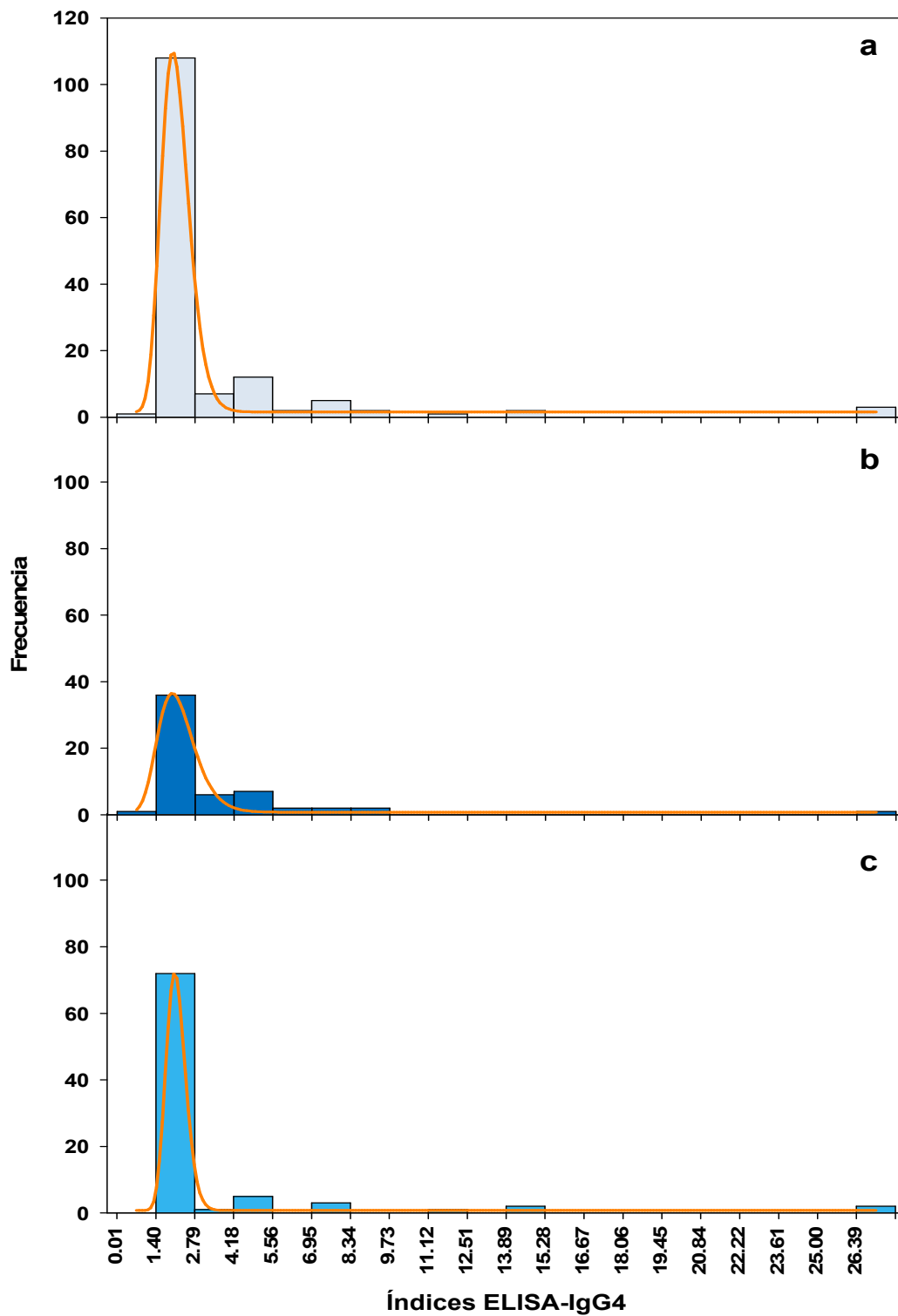


Figura 25. a. Distribución de los valores de índice para ELISA-IgG4 en: Todos los pacientes estudiados; **b.** Pacientes con PCR-rt-*Strongyloides* spp. positiva; **c.** Pacientes con PCR-rt-*Strongyloides* spp. negativa.

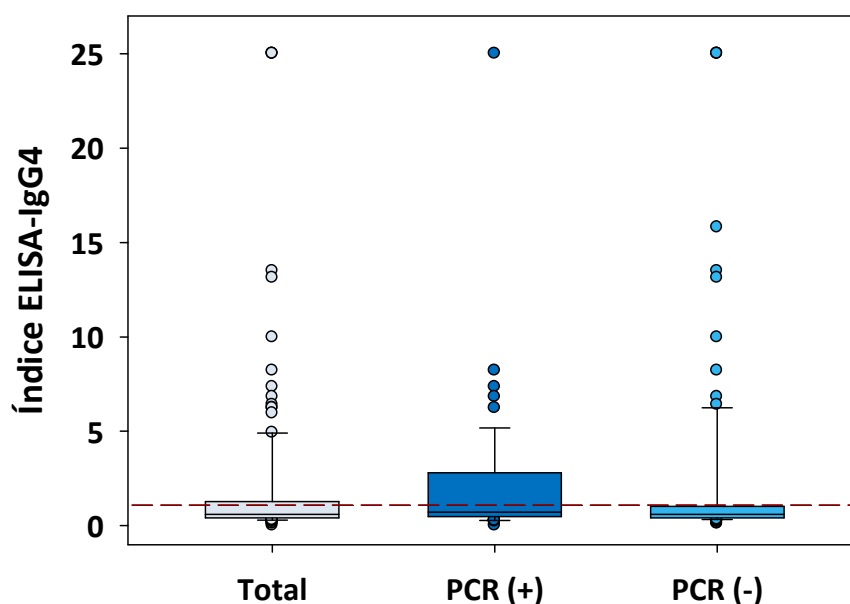


Figura 26. Diagrama de caja para los resultados de índice por ELISA-IgG4 en en todos los pacientes estudiados de forma conjunta y en los positivos y negativos para PCR-rt-*Strongyloides* spp.

La comparación de los resultados obtenidos por las técnicas de ELISA-IgG1 y de ELISA-IgG4 en los pacientes que presentaron un índice positivo y negativo por ELISA-IgG IVD no se realizó ya que sólo hubo 5 pacientes negativos para la técnica de ELISA-IgG IVD, siendo todos ellos negativos para el ELISA de subclases (IgG1 e IgG4).

Posteriormente, estos resultados se analizaron de forma cualitativa y para ello se construyeron las tablas de frecuencia 2 x 2 y se calculó el índice de Kappa para determinar el grado de concordancia entre las técnicas diagnósticas empleadas eliminando los datos de los pacientes indeterminados. En todos los casos la concordancia obtenida entre las diferentes técnicas serológicas, tras el cálculo del índice Kappa, resultó insignificante según los criterios establecidos en el apartado 3.3.11. de Material y Métodos (**Tabla 10**).

		ELISA-IgG IVD		Índice de Kappa (IC 95%) Concordancia
		Negativo	Positivo	
ELISA (IgG1 y/o IgG4)	Negativo	3	78	0,024 (-0,024 a 0,071) Insignificante
	Positivo	1	77	

		ELISA-IgG IVD		Índice de Kappa (IC 95%) Concordancia
		Negativo	Positivo	
ELISA-IgG1	Negativo	4	94	0,032 (0,0004 a 0,063) Insignificante
	Positivo	0	61	

		ELISA -IgG IVD		Índice de Kappa (IC 95%) Concordancia
		Negativo	Positivo	
ELISA-IgG4	Negativo	3	111	0,003 (-0,027 a 0,033) Insignificante
	Positivo	1	46	

		ELISA-IgG4		Índice de Kappa (IC 95%) Concordancia
		Negativo	Positivo	
ELISA-IgG1	Negativo	3	78	0,024 (-0,024 a 0,071) Insignificante
	Positivo	1	77	

Tabla 10. Tablas de frecuencia 2 x 2 e índice Kappa para las técnicas serológicas empleadas: ELISA-IgG IVD y ELISA para la determinación de subclases de isotipos IgG1 e IgG4.

Las tablas de frecuencia 2 x 2 y el índice de Kappa obtenido al comparar los resultados obtenidos por las técnicas moleculares y serológicas, tras haber eliminado los pacientes en los que no se obtuvo resultado molecular debido a la inhibición de la técnica PCR-rt-*Strongyloides* spp. y los considerados indeterminados por las técnicas serológicas, aparecen recogidas en la **Tabla 11**. La concordancia entre los resultados obtenidos por las técnicas serológicas y moleculares resultó insignificante, excepto en los resultados obtenidos por ELISA-IgG4 y la técnica PCR-rt-*Strongyloides* spp. donde se obtuvo una concordancia discreta.

		PCR-rt- <i>Strongyloides</i> spp.		Índice de Kappa (IC 95%) Concordancia
		Negativo	Positivo	
ELISA (IgG1 y/o IgG4)	Negativo	48	25	0,12 (-0,039 a 0,28) Insignificante
	Positivo	37	32	
		Negativo	Positivo	
ELISA-IgG1	Negativo	56	34	0,074 (-0,09 a 0,24) Insignificante
	Positivo	29	24	
		Negativo	Positivo	
ELISA-IgG4	Negativo	69	34	0,22 (0,057 a 0,38) Discreta
	Positivo	17	23	
		Negativo	Positivo	
ELISA -IgG IVD	Negativo	2	1	0,0054 (-0,033 a 0,044) Insignificante
	Positivo	82	57	

Tabla 11. Tablas de frecuencia 2 x 2 e índice Kappa para las técnicas serológicas en comparación con la técnica PCR-rt-*Strongyloides* spp.

Tras analizar las distribuciones de los valores de índices para ELISA-IgG IVD en pacientes con serología positiva y negativa por ELISA-IgG1 y/o IgG4, como se mostró en las **Figuras 15 y 16** y con los datos disponibles de PCR-rt-*Strongyloides* spp., se observó que los pacientes positivos por el ELISA de subclases eran aquellos que presentaban índices más altos para ELISA-IgG IVD. Por este motivo se categorizó el valor del índice obtenido por la técnica ELISA-IgG IVD en cuatro grupos (1 a 2; 2 a 3; 3 a 4 y >4) y se calculó el número y porcentaje de muestras positivas y negativas por ELISA a las subclases 1 y/o 4 en cada grupo. Se observó que el mayor número de muestras positivas por ELISA de subclases (80,56%) correspondía a las muestras que por ELISA-IgG IVD presentaron un índice mayor de 4 y el mayor número de negativos a ELISA de subclases se encontró en los pacientes positivos por ELISA-IgG IVD con un índice entre 1 y 2, aunque en las categorías de índice por ELISA-IgG IVD de 3 a 4 y de 2 a 3 se obtuvieron porcentajes del 50% y cercanos al 31%, respectivamente (**Tabla 12**).

Índice por ELISA-IgG IVD	n (%) de positivos a subclases (IgG1 y/o IgG4)		n (%) de negativos a subclases (IgG1 y/o IgG4)	
	6 (10,71%)		47 (83,93%)	
1 a 2 (n=53)	n (%) PCR-rt (+)	n (%) PCR-rt (-)	n (%) PCR-rt (+)	n (%) PCR-rt (-)
	3 (50,00%)	3 (50,00%)	17 (36,17%)	30 (63,83%)
2 a 3 (n=26)	8 (30,77%)		18 (69,23%)	
	n (%) PCR-rt (+)	n (%) PCR-rt (-)	n (%) PCR-rt (+)	n (%) PCR-rt (-)
	2 (25,00%)	6 (75,00%)	4 (22,22%)	14 (77,78%)
3 a 4 (n=10)	5 (50,00%)		5 (50,00%)	
	n (%) PCR-rt (+)	n (%) PCR-rt (-)	n (%) PCR-rt (+)	n (%) PCR-rt (-)
	2 (40,00%)	3 (60,00%)	2 (40,00%)	3 (60,00%)
>4 (n=72)	58 (80,56%)		14 (19,44%)	
	n (%) PCR-rt (+)	n (%) PCR-rt (-)	n (%) PCR-rt (+)	n (%) PCR-rt (-)
	22 (37,93%)	36 (62,07%)	3 (21,43%)	11 (78,57%)

Tabla 12. Número y porcentaje de resultados positivos y negativos por ELISA-IgG1 y/o IgG4 en relación a las categorías establecidas de índices obtenidos por ELISA-IgG IVD (1 a 2; 2 a 3; 3 a 4 y > 4).

Por otro lado, comparamos los resultados serológicos en relación al estado inmunológico de los pacientes. De los 182 pacientes reclutados, 49 de ellos eran individuos inmunosuprimidos, cuyas causas de inmunosupresión aparecen recogidas en la **Figura 27**, siendo la más frecuente la infección por el virus VIH seguido por el padecimiento de una enfermedad autoinmune sistémica.

Motivo de inmunosupresión

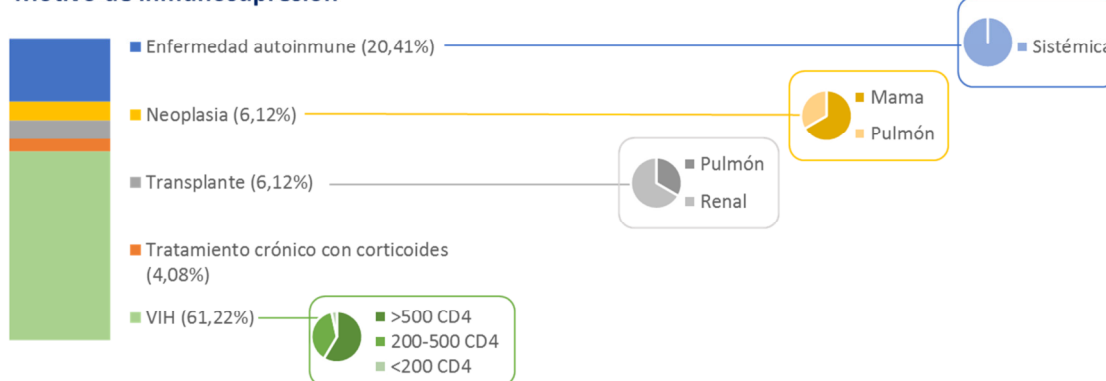


Figura 27. Causas de inmunosupresión de los pacientes del estudio con estatus de inmunodeprimidos.

En relación a los 48 pacientes inmunodeprimidos, 30 de ellos fueron pacientes positivos al virus VIH. En 29 de ellos se dispuso de muestra de suero, siendo 27 positivas por la técnica ELISA-IgG IVD y 2 indeterminadas. Además, de estas 29 muestras, 10 resultaron positivas por ELISA-IgG1 y/o IgG4. El análisis en fresco a partir de las muestras de heces se consiguió realizar en 13 pacientes de los cuales en 4 se analizó una única muestra, en 3 se analizaron 2 muestras y en 6 de ellos 3 muestras, resultando todas ellas negativas. En los 13 pacientes también se realizó el cultivo en agar, siendo positivos únicamente 3. La técnica de PCR-rt-*Strongyloides* spp. se pudo realizar en 26 muestras de estos pacientes obteniéndose 10 positivas. Hay que destacar que las 3 muestras positivas por cultivo en agar lo fueron también por la técnica PCR-rt-*Strongyloides* spp., al igual que las positivas por análisis en fresco (**Tabla 13**).

Causa de inmunosupresión	nº muestras	Técnicas diagnósticas					
		ELISA-IgG IVD		ELISA IgG-1 y/o IgG-4		PCR-rt- <i>Strongyloides</i> spp.	
		+	-	+	-	+	-
Enfermedad autoinmune	10*	8	2	6	4	5	4
Neoplasia	3	3	0	1	2	1	2
Transplante	3*	3	0	1	2	0	2
Tratamiento crónico con corticoides	2	1	1	0	2	0	2
VIH	30**	27	3	9	19	10	16

Tabla 13. Resultado de las técnicas empleadas para el análisis de las muestras de los pacientes con estatus de inmunodeprimidos según su causa de inmunosupresión. *a uno de los pacientes no se le pudo realizar la técnica PCR-rt-*Strongyloides* spp. **a dos pacientes no se les pudo realizar el ensayo ELISA-IgG1 y/o IgG4 y a 4 no se les pudo realizar la técnica PCR-rt-*Strongyloides* spp.

Por otro lado, es importante mencionar que uno de los dos pacientes positivos al virus HTLV-1 resultó ser negativo para la técnica ELISA-IgG1 con un índice de 0,22 pero positivo para IgG4 con un índice de 7,34 y positivo para ELISA-IgG IVD con un alto índice de 14. Además, este paciente fue positivo por PCR-rt-*Strongyloides* spp. y por el análisis en fresco en sus dos muestras de heces, no realizándose la técnica de cultivo en agar. Sin embargo, el otro paciente con serología positiva al virus, que además había sufrido una neoplasia, fue positivo para el ensayo ELISA-IgG1 con un índice de 1,32 y para ELISA-IgG IVD con un índice de 6,1 pero negativo para la subclase 4, PCR-rt-*Strongyloides* spp., análisis en fresco de sus tres muestras de heces y cultivo en agar.

La comparación de los resultados de los índices obtenidos por ELISA-IgG IVD, ELISA-IgG1 e IgG4 en la población inmunodeprimida e inmunocompetente a través de diagrama de cajas, así como con el test de Wilcoxon, reveló que existían diferencias muy significativas ($p < 0,01$) en los resultados obtenidos por ELISA-IgG IVD y por ELISA-IgG1 en ambas poblaciones, pero no para la subclase 4 (**Figura 28**).

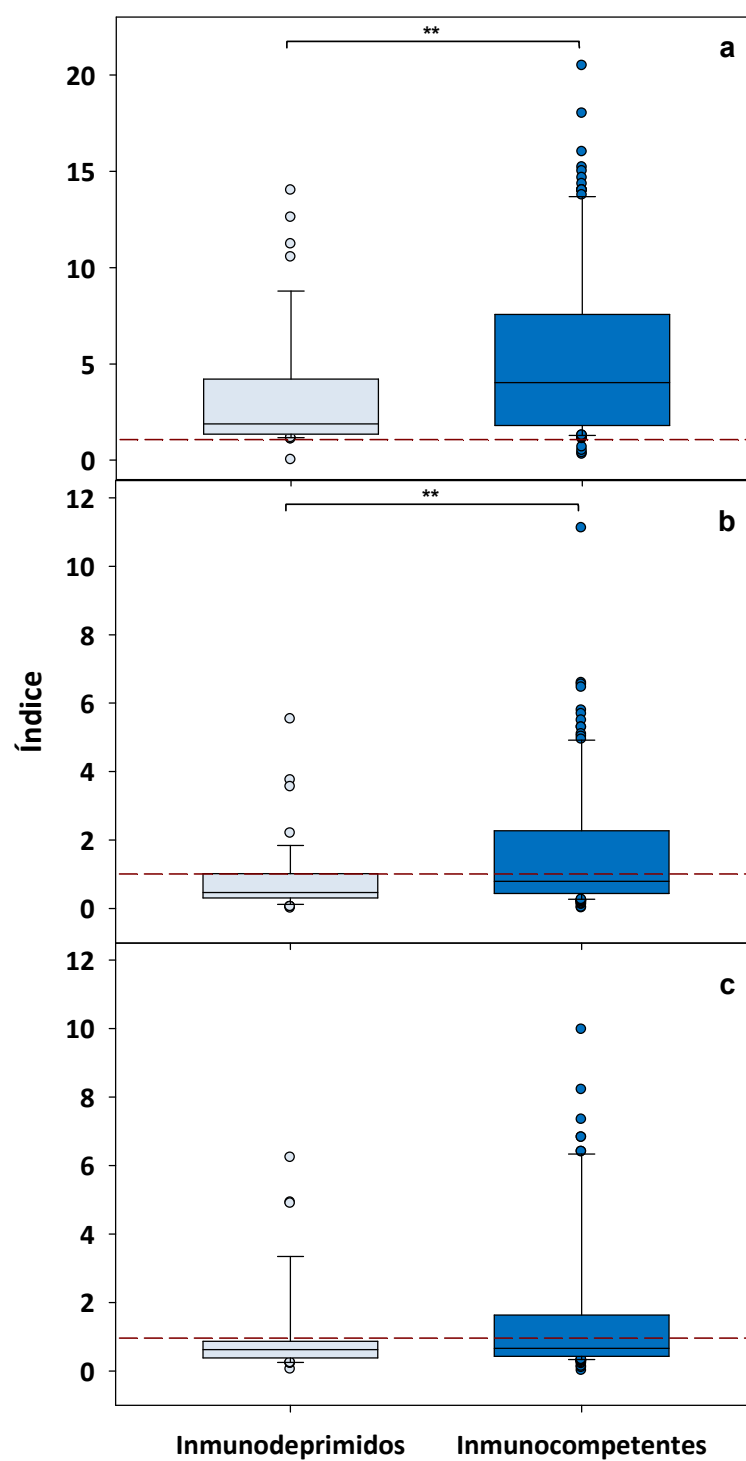


Figura 28. Diagrama de cajas de los valores de índice obtenidos en individuos inmunodeprimidos e inmunocompetentes por: **a.** ELISA-IgG IVD, **b.** ELISA-IgG1 y **c.** ELISA-IgG4. ** $p < 0,01$.

Todos aquellos pacientes que fueron diagnosticados por técnicas serológicas y/o moleculares fueron sometidos a tratamiento de acuerdo a los protocolos establecidos en los hospitales donde fueron reclutados. De los 178 pacientes que fueron positivos se consiguió realizar el seguimiento post-tratamiento a los 6 meses en 129 de ellos mediante las técnicas parasitológicas (análisis en fresco y cultivo en agar), serológicas (ELISA-IgG IVD y ELISA-IgG1 e IgG4) y moleculares (PCR-rt-*Strongyloides* spp.). Se compararon los resultados de los índices obtenidos por ELISA-IgG IVD, ELISA-IgG1 y ELISA-IgG4 antes y después del tratamiento mediante el test de Wilcoxon, observándose que existían diferencias altamente significativas ($p < 0,001$) entre los resultados obtenidos por las 3 técnicas en los pacientes pretratamiento y post-tratamiento (**Figura 29**). El análisis en fresco tras el tratamiento se llevó a cabo en 111 pacientes, de los cuales en 45 se analizó una única muestra, en 37 se dispuso de 2 muestras y en 29 de 3, siendo todas ellas negativas por dicho método. El cultivo en agar se realizó en 75 pacientes siendo todos negativos por dicho método. En referencia a los resultados de la técnica PCR-rt-*Strongyloides* spp. tras el tratamiento se dispuso de 94 muestras de heces, observando que de 43 muestras de pacientes positivos pretratamiento, 37 fueron negativas y 6 se mantuvieron positivas; mientras que de 51 muestras negativas, 50 fueron negativas y 1 positiva. De las 6 muestras positivas tras el tratamiento por PCR-rt-*Strongyloides* spp., únicamente una de ellos lo fue también por el ensayo ELISA-IgG4 resultando negativo tanto para el análisis por ELISA-IgG IVD como para el ELISA-IgG1. De las 37 que fueron negativas por PCR-rt-*Strongyloides* spp., 4 fueron positivas para la subclase 4 mientras que 7 para la subclase 1 y 1 muestra fue positiva para ambas subclases de inmunoglobulinas G (1 y 4). Por último, 5 muestras fueron positivas para el ELISA-IgG IVD y 2 fueron positivas para la subclase 1 y para el ensayo de ELISA-IgG-IVD.

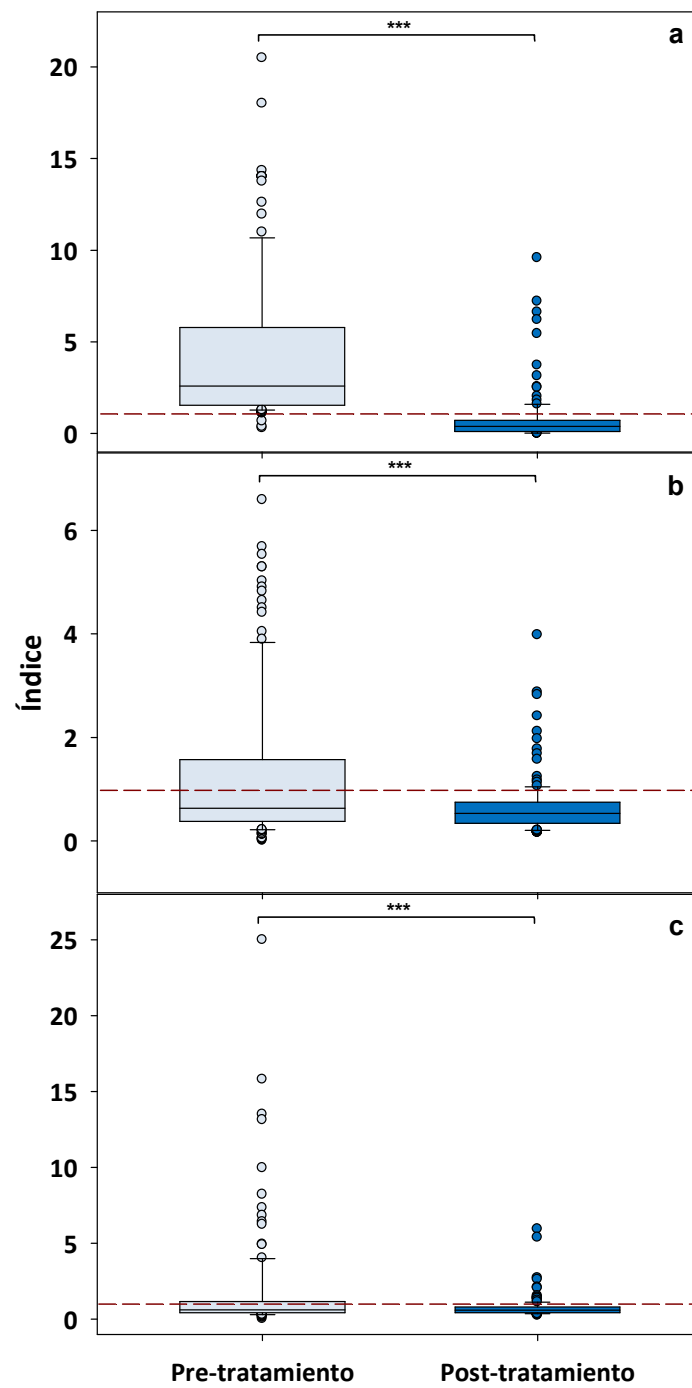


Figura 29. Diagrama de cajas de los valores de índice en pacientes antes y después del tratamiento obtenidos por: **a.** ELISA-IgG IVD; **b.** ELISA-IgG1; y **c.** ELISA-IgG4. *** $p < 0,001$.

Con respecto a los 48 pacientes inmunosuprimidos, se pudo realizar el seguimiento post-tratamiento mediante la técnica IVD a 37 (77,08%), obteniéndose diferencias altamente significativas ($p<0,001$) en los valores de índice antes y después del tratamiento (**Figura 30**). La comparación de los índices para IgG1 e IgG4 antes y después del tratamiento se realizó en 41 de los 48 pacientes (85,42%) y solo presentaron diferencias significativas en la subclase 1 ($p<0,05$) (**Figura 30**).

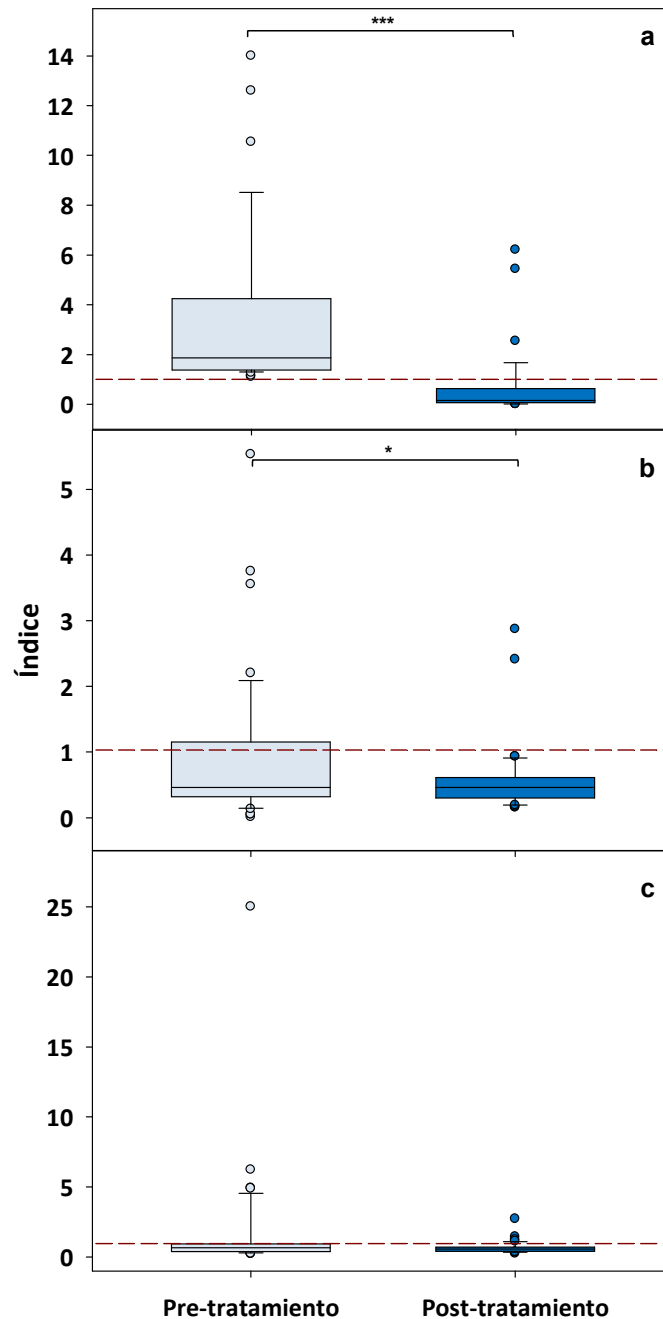


Figura 30. Diagrama de cajas de los valores de índice en pacientes inmunodeprimidos antes y después del tratamiento obtenidos por: **a.** ELISA-IgG IVD; **b.** ELISA-IgG1; y **c.** ELISA-IgG4. * $p<0,05$; *** $p<0,001$.

4.1.3. Aplicación de la técnica de ELISA-IgG1/IgG4 en muestras de suero de población general en zona endémica (Etiopía).

A la vista de las diferencias altamente significativas obtenidas en el apartado anterior al comparar los valores de los índices obtenidos para la técnica de ELISA-IgG1 e IgG4 en los pacientes antes y después del tratamiento, poniendo de manifiesto la utilidad de la determinación de las subclases de isotipos como evaluación de la eficacia del tratamiento y debido a la posibilidad de disponer de otras muestras de suero post-tratamiento, procedimos al análisis de éstas. En este caso los pacientes provenían de población general de zona endémica, región de Amhara (Etiopía) y previamente habían sido positivos por técnicas de detección directa (técnica de Baermann y PCR-rt-*Strongyloides* spp.). Se procedió a la aplicación de la técnica ELISA-IgG1 e IgG4 en las muestras de suero de dichos pacientes, definidas en el apartado 3.1.2.1. de Material y Métodos, y cuyas características aparecen descritas en el apartado 3.2.3. del mismo capítulo.

Tras el estudio serológico por el método de ELISA para la determinación de las subclases IgG1 e IgG4 de las 190 muestras de suero disponibles, se obtuvo que 19 de ellas (10,00%; 19/190) fueron positivas para cualquiera de las dos subclases (IgG1 y/o IgG4) mientras que 171 resultaron ser negativas. La subclase mayoritaria fue IgG1 encontrándose en 14 muestras (7,37%; 14/190), mientras que la subclase IgG4 estuvo presente en 8 de las muestras (4,21 %; 8/190). Únicamente 2 muestras (1,05%; 2/190) resultaron positivas para ambas subclases a la vez (IgG1 e IgG4). Por otro lado, desde el punto de vista parasitológico, de las 190 muestras de heces recogidas de los mismos pacientes, 55 fueron positivas por la técnica PCR-rt-*Strongyloides* spp. (28,95%; 55/190), de las cuales 5 pertenecían a pacientes que fueron positivos por la técnica ELISA-IgG1 y/o IgG4, siendo 3 de ellos positivos por ELISA-IgG1 y 2 por ambas subclases (IgG1 e IgG4). De las 135 muestras que resultaron negativas por PCR-rt-*Strongyloides* spp., 14 de ellas pertenecieron a pacientes que presentaron unos índices positivos por ELISA-IgG1 y/o IgG4, de manera que 9 lo fueron para la subclase G1 y 5 para la subclase G4, no encontrándose ningún paciente positivo para ambas subclases.

4.1.4. Diagnóstico de la estrongiloidiasis mediante el método de *Western Blot* (WB).

Con el fin de determinar las posibles bandas de carácter diagnóstico para *Strongyloides* spp. se empleó la técnica de *Western Blot* (WB) en los 4 grupos de sueros (1-4) descritos en el apartado 3.1.2.1. de Material y Métodos.

El método se desarrolló siguiendo el protocolo recogido en el apartado 3.3.4. de Material y Métodos a partir de 150 µg de un extracto proteico de *S. venezuelensis*, a

fraccionado en geles preparativos y transferido a una membrana de nitrocelulosa. Dicha membrana fue cortada en tiras, tal y como se describe en el apartado 3.3.4.3. de Material y Métodos que se enfrentaron a las diferentes baterías de suero mencionadas.

En primer lugar se analizaron un total de 10 sueros pertenecientes a pacientes con estrongiloidiasis parasitológicamente confirmada (grupo 1 del apartado 3.1.2.1. de Material y Métodos). El patrón de reconocimiento obtenido se muestra en la **Tabla 14**, caracterizado por la obtención de un *smear* en todos ellos, excepto en el nº 6, comprendido entre 27-41 kDa aproximadamente y destacando también la aparición de bandas de alto peso molecular.

ELISA		Bandas (kDa) en Western Blot																								
	Índice IVD	24	25	26	27	28	29	30	31	33	35	36	37	38	40	41	43	44	45	46	50	69	80	100	154	250
1	2,86																									
2	5,04																									
3	5,24																									
4	5,74																									
5	6,23																									
6	9,26																									
7	9,89																									
8	10,56																									
9	13,92																									
10	14,77																									

Tabla 14. Patrón de bandas reactivas por WB en los sueros parasitológicamente positivos a *Strongyloides* spp. y con índices entre 2-15 por ELISA-IgG IVD.

A continuación se analizaron 30 sueros de donantes negativos (grupo 4 del apartado 3.1.2.1. de Material y Métodos), los cuales presentaron diversos índices, desde 0,01 a 0,73 por ELISA-IgG IVD. En ninguno de los sueros se reconocieron proteínas por debajo de 40 kDa, pero sí proteínas de alto peso molecular en 8 de las muestras analizadas. Por otro lado, al analizar por WB los 20 sueros que presentaron un índice negativo por ELISA-IgG IVD pero que fueron positivos por el método ELISA a otras helmintiasis (grupo 3 del apartado 3.1.2.1. de Material y Métodos), se observó que en cuatro de estos sueros se reconocían proteínas de alto peso molecular (103 kDa; 90 kDa; 80 kDa; 80 kDa); en 3 de medio (69 kDa; 65 kDa; 50 kDa); y en uno de bajo (17 kDa). De manera que al superponer los patrones de reconocimiento el *smear* obtenido en los sueros de pacientes parasitológicamente confirmados con larvas en heces, comprendido en el rango de 27-41 kDa, no aparece reconocido por sueros negativos de donantes ni en sueros de pacientes con resultado positivo a otras helmintiasis afines, por lo que podrían encontrarse en él proteínas específicas confirmatorias del diagnóstico de estrongiloidiasis (**Tabla 15**).

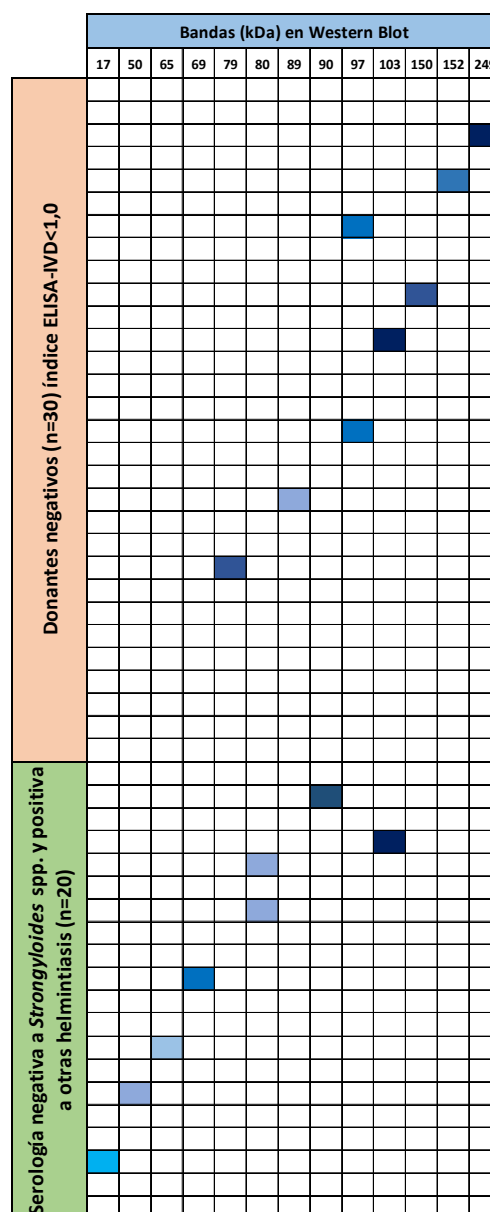


Tabla 15. Bandas reactivas obtenidas por WB en los sueros de donantes negativos y positivos por ELISA para otras helmintiasis.

Además, también se analizaron 42 sueros de pacientes con serología positiva por ELISA-IgG IVD, sin datos parasitológicos, con diversos índices desde 1,67 a 16,18 (grupo 2 del apartado 3.1.2.1. de Material y Métodos). El 76,18% de los sueros, con índices comprendidos entre 1,93 a 16,18, presentaron una o más bandas reactivas dentro del rango de 27-41 kDa, característico de las muestras de suero de pacientes con larvas en heces, y de ellos además, 19 en forma de *smear*. Por otro lado en estas muestras se aprecian patrones con diferencias muy marcadas a los descritos anteriormente. Es de destacar la presencia en 9 sueros (números 7, 8, 10, 13, 19, 24, 27 y 32) de un triplete de proteínas de 37 kDa, 41 kDa y 250 kDa, que en los cuatro primeros (7, 8, 10 y 13) va acompañado de bandas de 31 kDa y 33 kDa.

Además, hay un grupo de 8 sueros (números 14, 17, 22, 25, 28, 37, 40 y 42), todos ellos con un índice por ELISA-IgG IVD superior a 5, en los que aparecen bandas de 27 kDa a 30 kDa y otro (números 4, 6, 11, 23, 29, 36 y 39) con bandas de 30 a 35 kDa. Por último encontramos que 3 de los sueros (números 1, 3 y 5) analizados con índices de 1-2 sólo reconocieron bandas de alto peso molecular y en 3 sueros (números 26, 30 y 35) no se obtuvo patrón de reconocimiento (**Tabla 16**).

	ELISA	Bandas (kDa) en Western Blot																							
	Índice IVD	24	25	26	27	28	29	30	31	33	35	36	37	38	41	43	44	45	46	50	69	100	154	250	
1	1,67																								
2	1,75																								
3	1,87																								
4	1,93																								
5	2,15																								
6	2,34																								
7	2,60																								
8	2,81																								
9	3,41																								
10	3,74																								
11	3,78																								
12	4,76																								
13	4,93																								
14	5,01																								
15	5,52																								
16	5,69																								
17	5,99																								
18	6,07																								
19	6,29																								
20	6,56																								
21	6,62																								
22	6,64																								
23	7,37																								
24	7,50																								
25	8,14																								
26	8,25																								
27	8,67																								
28	8,69																								
29	9,08																								
30	9,33																								
31	10,32																								
32	10,73																								
33	11,50																								
34	11,55																								
35	11,75																								
36	12,58																								
37	12,82																								
38	13,55																								
39	14,85																								
40	14,98																								
41	15,71																								
42	16,18																								

Tabla 16. Bandas reactivas obtenidas por WB en los sueros serológicamente positivos por ELISA-IgG IVD a *Strongyloides* spp.

4.2. Diagnóstico molecular de geohelmintiasis.

4.2.1. Extracción de ADN a partir de muestras de heces: comparación de protocolos de extracción.

Se utilizaron 4 kits comerciales de extracción de ADN con el fin de seleccionar el que mejor rendimiento presentase, en términos de concentración y calidad de ADN, para el aislamiento a partir de huevos de helmintos sabiendo que uno de ellos, el kit de *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), ya se ha utilizado con éxito en la extracción del ADN a partir de muestras de heces con larvas de *Strongyloides* spp.

La extracción se llevó a cabo en una de las muestras de heces de donantes sanos españoles elegida al azar (apartado 3.1.2.2. de Material y Métodos), la cual fue previamente concentrada según el apartado 3.3.5. del mismo capítulo. Distintas alícuotas de esta muestra se doparon artificialmente con huevos de *A. lumbricoides* y *T. trichiura* tal y como aparece descrito en el apartado 3.3.6. de Material y Métodos.

La prueba de extracción para los huevos de *A. lumbricoides* se realizó en 12 alícuotas del concentrado de la muestra de heces del donante sano, utilizando 8 de ellas para el dopaje (A1-A8) y 4 como controles negativos (N1_A-N4_A) y empleando los cuatro kits de extracción de ADN que aparecen recogidos en la **Tabla 17**.

Nombre del Kit	Muestras	
	Negativas	Dopadas
<i>QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit</i>	N1 _A	A1 A2
<i>Speedtools tissue DNA extraction Kit</i>	N2 _A	A3 A4
<i>Favorprep Stool DNA Isolation Mini Kit</i>	N3 _A	A5 A6
<i>PowerSoil DNA Isolation Kit</i>	N4 _A	A7 A8

Tabla 17. Muestras de heces negativas y dopadas con huevos de *A. lumbricoides* utilizadas con los diferentes kits de extracción de ADN.

Siguiendo los protocolos de trabajo descritos en el apartado 3.3.7.2. de Material y Métodos para cada uno de los kits utilizados, los resultados de concentración y pureza de los ADNs obtenidos al cuantificarlos por Nanodrop ND-1000 aparecen recogidos en la **Tabla 18**.

Kit	Muestra	[ADN] (ng/μl)	Pureza	
			A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
<i>QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit</i>	N1 _A	20,58	1,55	0,55
	A1	14,65	1,70	0,80
	A2	15,12	1,67	0,70
<i>Speedtools tissue DNA extraction Kit</i>	N2 _A	55,19	1,35	0,39
	A3	41,15	1,44	0,46
	A4	68,08	1,42	0,58
<i>Favorprep Stool DNA Isolation Mini Kit</i>	N3 _A	94,32	1,80	1,66
	A5	98,53	1,80	1,64
	A6	87,01	1,83	1,59
<i>PowerSoil DNA Isolation Kit</i>	N4 _A	10,59	1,41	0,78
	A7	10,38	1,40	0,60
	A8	12,66	1,33	0,68

Tabla 18. Concentración en ng/μl y pureza en las distintas extracciones de ADN de las muestras de heces negativas y dopadas experimentalmente con huevos de *A. lumbricoides*.

Igualmente en la prueba de extracción de ADN para los huevos de *T. trichiura* se emplearon 12 alícuotas del concentrado de la muestra de heces del donante sano, utilizando 4 de ellas como controles negativos (N1_T-N4_T) y 8 para el dopaje (T1-T8) según aparece en la **Tabla 19**.

Nombre del Kit	Muestras	
	Negativas	Dopadas
<i>QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit</i>	N1 _T	T1 T2
<i>Speedtools tissue DNA extraction Kit</i>	N2 _T	T3 T4
<i>Favorprep Stool DNA Isolation Mini Kit</i>	N3 _T	T5 T6
<i>PowerSoil DNA Isolation Kit</i>	N4 _T	T7 T8

Tabla 19. Muestras de heces negativas y dopadas con huevos de *Trichuris* spp. utilizadas con los diferentes kits de extracción de ADN.

Los resultados de concentración y pureza de los ADNs obtenidos siguiendo los protocolos de cada uno de los kits empleados tras su cuantificación por Nanodrop ND-1000 aparecen recogidos en la **Tabla 20**.

Kit	Muestra	[ADN] (ng/μl)	Pureza	
			A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
<i>QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit</i>	N1 _T	30,11	1,93	0,77
	T1	25,37	1,76	1,00
	T2	25,13	1,97	0,86
<i>Speedtools tissue DNA extraction Kit</i>	N2 _T	53,14	1,57	0,79
	T3	39,40	1,31	0,47
	T4	58,03	1,44	0,64
<i>Favorprep Stool DNA Isolation Mini Kit</i>	N3 _T	84,14	1,80	1,57
	T5	61,11	1,74	1,30
	T6	46,24	1,82	1,48
<i>PowerSoil DNA Isolation Kit</i>	N4 _T	14,25	1,99	1,78
	T7	13,84	1,86	1,85
	T8	5,45	1,78	2,06

Tabla 20. Concentración en ng/μl y pureza en las distintas extracciones de ADN de las muestras de heces negativas y dopadas experimentalmente con huevos de *T. trichiura*.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el mejor método de extracción en términos de cantidad de ADN obtenido y pureza del mismo, tanto para el caso de muestras artificialmente inoculadas con *A. lumbricoides* como con *T. trichiura*, es el método *Favorprep Stool DNA Isolation Mini Kit*, tal como aparece remarcado en la **Tablas 18 y 20**, seguido del *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit*.

4.2.2. Protocolos de amplificación por PCR en tiempo real (PCR-rt) en formato simple para *Ascaris* spp., *Trichuris* spp., *Necator* spp., *Ancylostoma* spp. y *Strongyloides* spp.

Inicialmente, nos propusimos desarrollar un método de PCR en tiempo real en formato simple para cada uno de los geohelminthos del estudio: *Ascaris* spp., *Trichuris* spp., *Necator* spp., *Ancylostoma* spp. y *Strongyloides* spp. Nuestro primer paso fue trasladar la técnica de PCR-rt-*Strongyloides* spp. con *SybrGreen*, descrita y utilizada de forma rutinaria por nuestro grupo de investigación, a un método de PCR en tiempo real utilizando sondas de hidrólisis. Para ello, se sintetizó una sonda marcada con el fluoróforo FAM (ver **Tabla 4** de

Material y métodos) complementaria a las bases 56 a 75 del amplicón de 101 pb (1530 a 1630) de la región 18S del ARNr de *Strongyloides* spp. (GenBank: AF279916.2). En un volumen final de 25 µL, se emplearon los cebadores y la sonda a una concentración de 100 nM. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron de 15 minutos a 95 °C seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 9 segundos y 60 °C durante 60 segundos. Se utilizó como control positivo 5 ng de ADN genómico de L3 de *S. venezuelensis* y como control negativo ADN extraído de una muestra de heces de un individuo donante sano mediante el kit *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* (apartado 3.3.10.2. de Material y Métodos). El análisis de los datos se realizó con el programa Rotor Gene 6000 Series software versión 1.7 considerándose una muestra positiva cuando se obtuvo un incremento significativo de fluorescencia por encima del umbral establecido para la sonda. Posteriormente se llevó a cabo la optimización del resto de protocolos en formato simple para *Ascaris* spp., *Trichuris* spp., *Necator* spp. y *Ancylostoma* spp. Se utilizaron las sondas para cada geohelminto a una concentración de 100 nM y los cebadores a una concentración de 100 nM para *Ancylostoma* spp., *Necator* spp. y de 60 nM para *Trichuris* spp. y *Ascaris* spp. (**Tabla 4** del apartado 3.3.10.1. de Material y Métodos). Los fragmentos de amplificación obtenidos fueron de 88, 71 y 56 pb de la región ITS-1 de *Ascaris* spp., *Ancylostoma* spp. y *Trichuris* spp., respectivamente y de 101 pb de la región ITS-2 de *Necator* spp. El volumen final de reacción y las condiciones de amplificación fueron las mismas que para la detección de *Strongyloides* spp. anteriormente descritas, utilizando como control positivo 5 ng de ADN genómico de cada geohelminto, extraído según aparece recogido en el apartado 3.3.7.1. de Material y Métodos, a partir de un fragmento de adulto de *A. lumbricoides*, larvas de uncinarias procedentes de un cultivo en agar y adultos de *T. muris*. Como control negativo de nuevo se incluyó el ADN extraído de la muestra de heces de un individuo donante sano mediante el kit *QIAamp Fast DNA Stool Min kit*.

Para establecer los límites de detección se realizaron diluciones seriadas del ADN genómico de cada geohelminto anteriormente citados. Se partió en todos ellos de 100 ng de ADN y se realizaron diluciones seriadas desde la dilución 1/10 hasta 1/10.000.000, por duplicado. En los ensayos realizados se estableció el límite de detección en 0,10 pg para cada geohelminto.

Una vez optimizados los protocolos de amplificación en formato simple para los geohelminthos de estudio se procedió a evaluar, en términos de amplificación utilizando dichos protocolos, el ADN obtenido mediante los 4 kits comerciales de *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit*, *Speedtools tissue DNA extraction Kit*, *Favorprep Stool DNA Isolation Mini Kit* y *PowerSoil DNA Isolation Kit* de las muestras dopadas con huevos de *A. lumbricoides* y de *T.*

trichiura. En el caso de las muestras dopadas con huevos de *A. lumbricoides* únicamente se observó amplificación en las muestras de heces extraídas con el kit *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* y en uno de los duplicados de la muestra dopada extraída con el kit *PowerSoil DNA Isolation Kit*. Con las muestras extraídas con el método *Favorprep Stool DNA Isolation Mini Kit* se obtuvo un resultado de inhibición de la PCR, por lo que se procedió a diluir las muestras utilizando una dilución 1/10 de las mismas, pero aún así no se obtuvo amplificación en ninguna de ellas. En el caso de las muestras de heces dopadas con huevos de *T. trichiura*, no se obtuvo amplificación para ninguna de las extracciones, excepto en las obtenidas con el kit de *Favorprep Stool DNA Isolation Mini Kit*.

Dado estos resultados, junto con los valores de concentración y pureza obtenidos anteriormente para estos ADNs, se escogió el método *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* para llevar a cabo la extracción de las muestras de heces de pacientes con sospecha de padecer geohelmintiasis pero incluyendo dos pasos previos de lisis: i) agitación de la muestra durante 5 minutos con bolas de vidrio de diferentes tamaños, y ii) incubación de la muestra a 95°C durante 10 minutos, pasos que aporta el protocolo de *Favorprep Stool DNA Isolation Mini Kit* con el fin de conseguir una mayor eficiencia en la extracción, con mejor rotura de los parásitos y mayor rendimiento de ADN.

4.2.3. Protocolo de amplificación por PCR en tiempo real en formato múltiplex.

Una vez elegido el método de extracción de ADN más adecuado y estandarizado el protocolo de amplificación en formato simple para cada geohelminto se procedió a desarrollar un protocolo en formato múltiplex a partir de los mismos, con el objetivo de que una sola reacción de PCR nos permitiera identificar los cinco geohelminthos de nuestro estudio (PCR-rt-múltiplex). Se emplearon los mismos cebadores y las mismas sondas que en formato simple (**Tabla 4** del apartado 3.3.10.1. de Material y Métodos). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl incluyendo los cebadores a una concentración de 100 nM para *Ancylostoma* spp., *Necator* spp. y *Strongyloides* spp., y de 60 nM para *Trichuris* spp. y *Ascaris* spp., y todas las sondas a una concentración de 100 nM. Se utilizó un programa de amplificación de 15 minutos a 95 °C, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 9 segundos y 60 °C durante 60 segundos. Como controles positivos se incluyeron los ADNs genómicos individuales de cada parásito a la misma concentración que en formato simple y un control denominado mixto, que incluyó 5 ng de ADN genómico de cada uno de los 5 parásitos. Como control negativo se empleó el ADN extraído con el kit *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* de una muestra de heces de un individuo sano realizando los pasos de lisis como se describe en el apartado anterior. En los ensayos realizados se observó que la amplificación era específica

para cada canal sin existir interferencia entre ellos y se consideró una muestra positiva cuando se obtuvo un incremento de fluorescencia significativo por encima del umbral establecido de cada sonda mediante el programa Rotor Gene 6000 Series software versión 1.7.

Para comprobar la especificidad de la técnica se analizaron los ADNs de diferentes parásitos intestinales (*Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, *Blastocystis* spp., *Anisakis* spp.) y tisulares (*Echinococcus granulosus* s.l., *Loa loa*, *Mansonella* spp.) (apartado 3.1.1.1. de Material y Métodos), verificándose que no se obtuvo amplificación para ninguno de ellos.

4.2.4. Evaluación de la técnica PCR-rt-múltiplex en muestras clínicas de heces de pacientes inmigrantes o viajeros, con sospecha de padecer geohelmintiasis.

Se realizó un ensayo preliminar, con muestras de heces de pacientes procedentes del Hospital Universitario Severo Ochoa en Madrid, analizando un total de 97 muestras pertenecientes a 65 pacientes. En 24 de ellos se recogieron 2 muestras, en 8 pacientes 3 muestras, y en 25 tan solo se pudo recoger 1 muestra. El rango de edad se encontró entre 1-80 años, siendo la media 34,11 años y la mediana de 37,00. El número de mujeres fue de 34 y el de hombres 31. En cuanto a su origen, sólo uno de los pacientes analizados procedió del continente asiático (China), 56 del continente africano [Angola (n=1), Camerún (n=3), Congo (n=2), Guinea Conakry (n=2), Guinea Ecuatorial (n=27), Nigeria (n=20) y Senegal (n=1)], tres del continente americano [Honduras (n=1), Bolivia (n=1), Perú (n=1)] y cinco del continente europeo (España).

De las 97 muestras analizadas 10 de ellas, correspondientes a 8 pacientes, fueron positivas para algún geohelminto. Uno de los 8 pacientes presentó 2 muestras, de las 3 que se recogieron, positivas para *Trichuris* spp. Para un paciente del que se disponía de 2 muestras, 1 de ellas fue positiva para *Strongyloides* spp. En 5 pacientes de los que sólo se obtuvo una muestra, 2 fueron positivos para *Necator* spp., y 3 para *Strongyloides* spp. Por último, en un paciente con 2 muestras se encontró una coinfección, 1 de ellas fue positiva para *Strongyloides* spp. y *Trichuris* spp. y otra para *Trichuris* spp. y *Ascaris* spp. Todos los pacientes positivos fueron africanos, 5 de ellos mujeres y 3 hombres con una edad comprendida entre 2 y 71 años. Tres de ellos presentaron eosinofilia y, además uno de ellos, prurito y dolor abdominal.

Posteriormente, se procedió a la aplicación de esta metodología en las muestras de heces de 122 pacientes (111 inmigrantes y 11 viajeros) reclutados en el Hospital de Poniente-

El Ejido (n=14) en Almería, Hospital Universitario Vall d'Hebrón (n=55) y Unidad de Salud Internacional de Drassanes (n=53) ambos en Barcelona, con sospecha de padecer geohelmintiasis (**Figura 31**). La información epidemiológica, clínica y analítica de cada paciente fue incluida en una ficha que fue común para los tres hospitales de estudio (en el **Anexo 2** aparece el modelo del Cuestionario de estudio de geohelminthos y *Strongyloides stercoralis*).

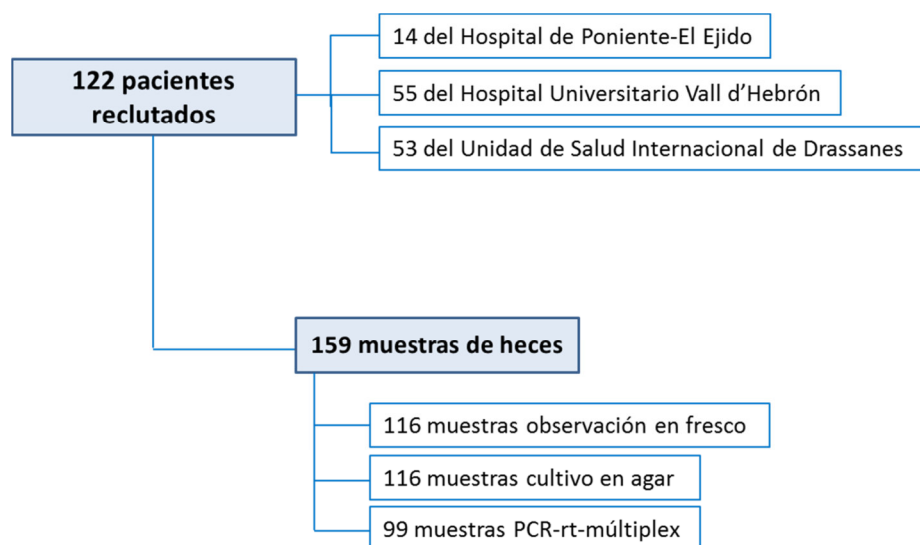


Figura 31. Diagrama de los pacientes reclutados y las muestras obtenidas de los mismos para cada prueba diagnóstica.

De todos los pacientes, 53 eran mujeres y 69 hombres. La edad de los pacientes se encontró entre 15 y 88 años, con una media de 37,48 y una mediana de 37,27. El país de origen de los 111 pacientes inmigrantes aparece reflejado en la **Figura 32**. El 60% de estos pacientes procedió de América, siendo el país más frecuente Bolivia (54,41%) seguido de Ecuador (13,24%). El continente africano representó un 29% del total de los pacientes inmigrantes, mayoritariamente de Guinea Ecuatorial (18,18%) y de Guinea Bissau (12,12%). Asia representó el 11%, siendo Bangladesh (46,15%) y Pakistán (38,46%) los países de origen más frecuentes. De los 11 viajeros: 1 viajó al continente asiático (Georgia), 2 viajaron a África (1 a Camerún y otro a Marruecos), 1 a América (Bolivia), 3 a Europa (1 a Inglaterra, 1 a Letonia y 1 a Bélgica) y en los 4 restantes se desconocía el país de destino.

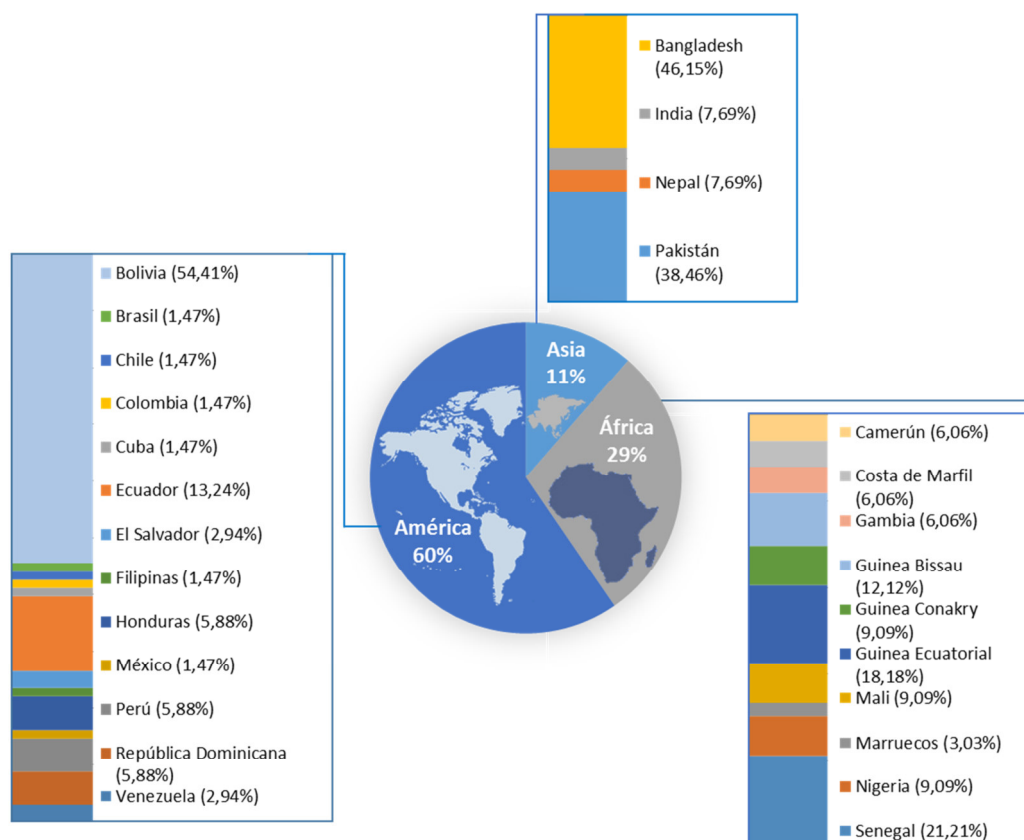


Figura 32. Origen geográfico (%) de los pacientes inmigrantes incluidos en el estudio.

En cuanto a los antecedentes clínicos, 97 de ellos no presentaban manifestaciones alérgicas, 23 sí (16 de forma leve y 7 moderada) y de 2 no se dispuso de este dato. De los 122 pacientes estudiados 3 de ellos se encontraban inmunocomprometidos, siendo el motivo de uno de ellos una infección por el virus VIH y desconociéndose las causas en el resto. Ningún paciente había sido sometido a transplante ni había padecido enfermedades autoinmunes y sólo uno de ellos había sufrido una neoplasia de mama.

Para la evaluación de los criterios clínicos, se consideró un paciente con eosinofilia cuando presentaba más de 500 eosinófilos/ μ l o un valor relativo superior al 7%, categorizándose en leve cuando el número de eosinófilos/ μ l se situaba entre 500 y 1500, moderada entre 1500 y 3000, y grave más de 3000. Por otro lado, la IgE se consideró elevada cuando su valor fue superior a 500 U/ml. En cuanto al nivel de hemoglobina, se estableció que un paciente sufría anemia cuando la hemoglobina presentó un valor inferior a 12 g/dl.

La información clínica y analítica recogida de la población analizada aparece detallada por hospitales en las **Figuras 33 a 35**.

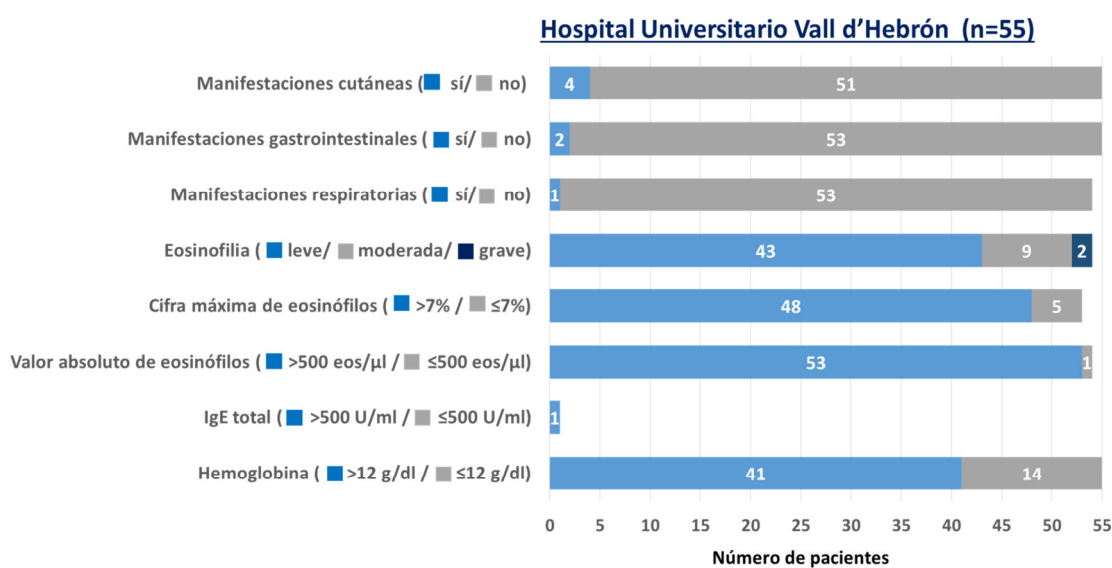


Figura 33. Manifestaciones clínico-analíticas de los pacientes atendidos en el Hospital Universitario Vall d'Hebrón (Barcelona).

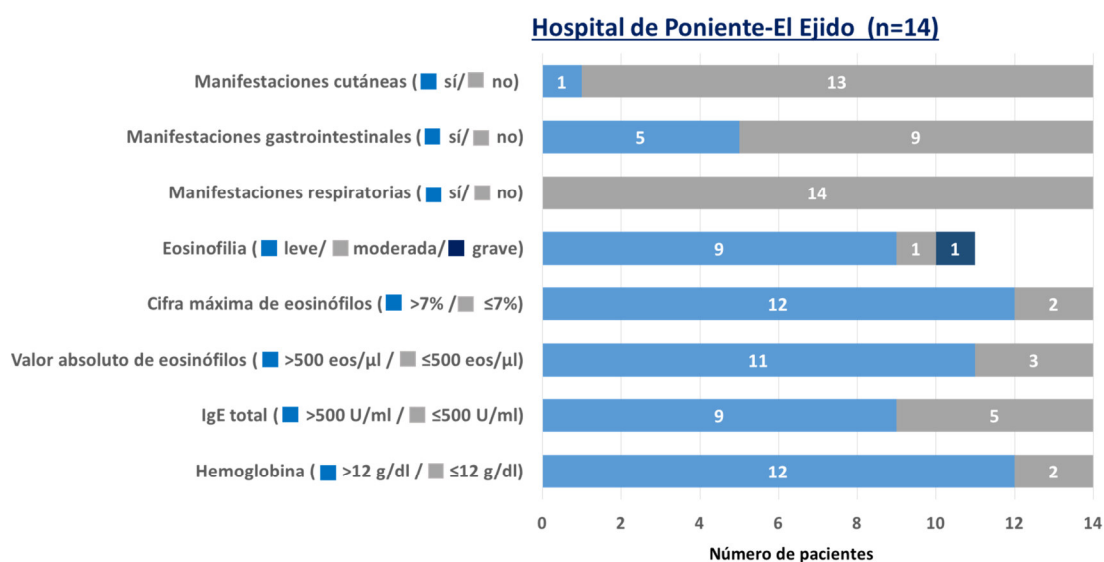


Figura 34. Manifestaciones clínico-analíticas de los pacientes atendidos en el Hospital de Poniente-El Ejido (Almería).

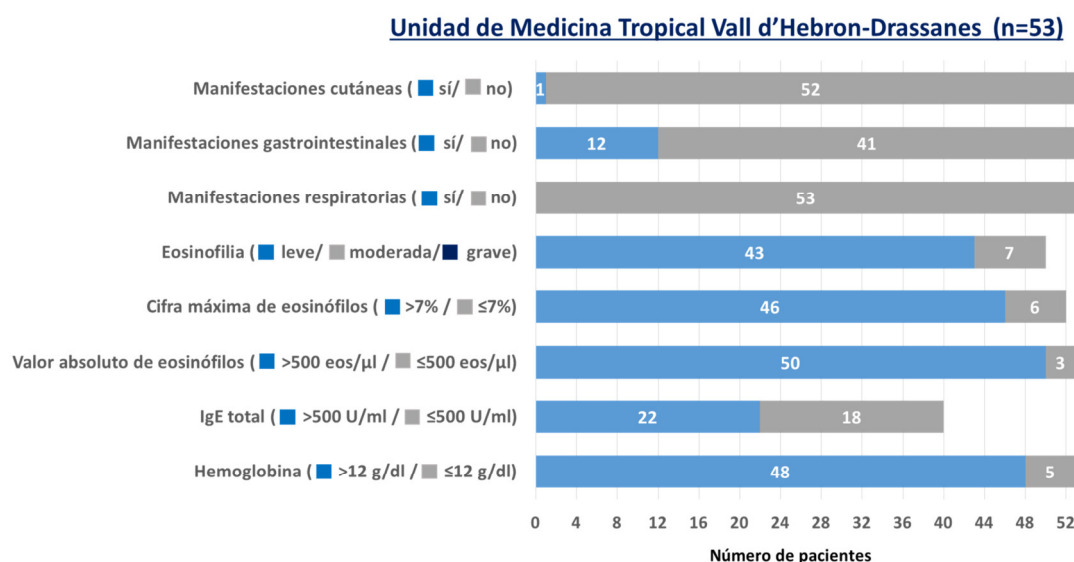


Figura 35. Manifestaciones clínico-analíticas de los pacientes atendidos en la Unidad de Salud Internacional de Drassanes (Barcelona).

Tal y como aparece recogido en el apartado 3.3.1. de Material y Métodos en cada hospital se llevaron a cabo las técnicas parasitológicas convencionales de análisis en fresco y cultivo en agar. Es de destacar que tras la realización del examen en fresco el geohelminto mayoritariamente encontrado fue *Strongyloides* spp., detectándose en 29 pacientes de los 116 analizados. En menor medida se detectaron también el resto de geohelminths de manera que 6 de los 116 pacientes analizados fueron positivos para *Ascaris* spp., 10 para uncinarias y por último 5 para *Trichuris* spp.

En cuanto a los resultados obtenidos mediante el cultivo en agar, 29 pacientes fueron positivos para *Strongyloides* spp. y 7 para uncinarias, siendo el resto negativos.

En referencia a los resultados por PCR-rt-múltiplex para la detección de geohelminths, se dispuso de 99 muestras de heces detectándose un total de 33 pacientes positivos, de los cuales 30 presentaron infección por un solo geohelminto: 26 pacientes fueron positivos a *Strongyloides* spp., 1 a *Ancylostoma* spp., 1 a *Necator* spp. y 2 a *Ascaris* spp.; 3 pacientes presentaron multi-infección por dos geohelminths: 1 paciente positivo a *Ascaris* spp. y *Strongyloides* spp.; 1 positivo a *Necator* spp. y *Strongyloides* spp. y 1 positivo a *Ancylostoma* spp. y *Strongyloides* spp.

En la comparación de los resultados obtenidos por la técnica parasitológica de análisis en fresco y molecular de PCR-rt-múltiplex se observó que de los 29 pacientes positivos para *Strongyloides* spp. por visualización de las larvas en el análisis en fresco, 5 se confirmaron por PCR-rt-múltiplex para *Strongyloides* spp. y 6 fueron positivas para

Ancylostoma spp.; de los 6 positivos a *Ascaris* spp., 3 fueron confirmados por la PCR-rt-múltiplex; de los 10 positivos a uncinarias, 2 fueron positivos a *Necator* spp. y de los 5 positivos para *Trichuris* spp., la técnica PCR-rt-múltiplex únicamente se pudo realizar en una muestra resultando ésta negativa.

Por otro lado, de los 29 pacientes positivos por cultivo en agar para *Strongyloides* spp., 10 de ellos fueron positivos por PCR-rt-múltiplex y de los 67 negativos por cultivo 5 fueron detectados por la técnica molecular. En cuanto a los 7 positivos para uncinarias obtenidos por cultivo en agar, 1 fue positivo para *Ancylostoma* spp., 1 para *Necator* spp. y 1 para *Strongyloides* spp. por la técnica de PCR-rt-múltiplex.

Se comparó mediante un análisis de chi-cuadrado la presencia o ausencia de geohelmintiasis, determinada mediante las técnicas parasitológicas (análisis en fresco y/o cultivo en agar), la técnica PCR-rt-múltiplex y una combinación de las 3 técnicas directas (PCR-rt-múltiplex y/o técnicas parasitológicas) con las variables clínico-analíticas recogidas por los hospitales no observándose diferencias significativas. Además, se calculó la probabilidad de *odds ratio* (POR) de estas variables, así como el intervalo de confianza al 95% (95% IC) y el *p*-valor. Las variables “Síndrome de hiperinfección” y “Manifestaciones respiratorias” no se pudieron incluir en el análisis debido al bajo número de datos disponible (Tablas 21 a 23).

Variable (nº de observaciones perdidas)	Categoría	Casos ^a	No casos ^b	POR	95% IC	P-valor
Manifestaciones gastrointestinales (7)	Sí	11	6	2,61	0,90-8,28	0,11
	No	40	58	Ref.		
Manifestaciones cutáneas (7)	Sí	4	2	2,53	0,45-21,15	0,40
	No	47	62	Ref.		
Hemoglobina (g/dl) (6)	>12	43	52	1,10	0,42-2,96	1,00
	≤12	9	12	Ref.		
IgE /U/ml) (71)	>500	19	10	0,49	0,14-1,40	0,17
	≤500	10	12	Ref.		
% eosinófilos (6)	>7%	47	53	1,91	0,63-6,60	0,29
	≤7%	5	11	Ref.		
Eosinofilia (eosinófilos/μl) (6)	>500	47	52	2,12	0,72-7,26	0,20
	≤500	5	12	Ref.		

Tabla 21. Cálculo de la *odds ratio* de las variables clínico-analíticas. ^aCasos: positivo para al menos un geohelminto por técnicas parasitológicas y ^bNo casos: negativo por técnicas parasitológicas.

Variable (nº de observaciones perdidas)	Categoría	Casos ^a	No casos ^b	POR	95% IC	P-valor
Manifestaciones gastrointestinales (27)	Sí	3	15	0,37	0,08-1,25	0,11
	No	28	49	Ref.		
Manifestaciones cutáneas (27)	Sí	1	4	0,55	0,02-4,21	0,54
	No	30	60	Ref.		
Hemoglobina (g/dl) (27)	>12	24	55	0,44	0,14-1,35	0,13
	≤12	8	8	Ref.		
IgE /U/ml) (73)	>500	9	19	1,17	0,34-4,31	0,79
	≤500	6	15	Ref.		
% eosinófilos (28)	>7%	3	10	1,79	0,49-8,93	0,37
	≤7%	29	52	Ref.		
Eosinofilia (eosinófilos/μl) (27)	>500	29	55	1,36	0,35-6,96	0,63
	≤500	3	8	Ref.		

Tabla 22. Cálculo de la *odds ratio* de las variables clínico-analíticas. ^aCasos: positivo para al menos un geohelminto por PCR-rt-múltiplex y ^bNo casos: negativo por PCR-rt-múltiplex.

Variable (nº de observaciones perdidas)	Categoría	Casos ^a	No casos ^b	POR	95% IC	P-valor
Manifestaciones gastrointestinales (3)	Sí	9	10	0,87	0,31-2,36	0,81
	No	51	49	Ref.		
Manifestaciones cutáneas (3)	Sí	3	3	0,98	0,16-5,94	0,16
	No	57	56	Ref.		
Hemoglobina (g/dl) (3)	>12	50	48	0,95	0,36-2,48	1,00
	≤12	11	10	Ref.		
IgE (U/ml) (68)	>500	21	9	2,69	0,88-8,65	0,10
	≤500	11	13	Ref.		
% eosinófilos (4)	>7%	55	47	1,92	0,65-6,15	0,29
	≤7%	6	10	Ref.		
Eosinofilia (eosinófilos/μl) (3)	>500	55	48	1,44	0,49-4,59	0,59
	≤500	10	6	Ref.		

Tabla 23. Cálculo de la *odds ratio* de las variables clínico-analíticas. ^aCasos: positivo para al menos un geohelminto por técnicas directas y ^bNo casos: negativo por técnicas directas.

Los 52 pacientes que resultaron positivos por técnicas parasitológicas a algún geohelminto (análisis en fresco y/o cultivo en agar) fueron sometidos a tratamiento según los criterios establecidos por cada hospital. De éstos, en 26 pacientes se pudo realizar el seguimiento post-tratamiento a los 3 meses, aplicándose las técnicas parasitológicas de análisis en fresco y cultivo en agar y la técnica molecular de PCR-rt-múltiplex. Es importante reseñar que tras la administración del tratamiento de acuerdo a los protocolos establecidos en cada uno de los hospitales participantes, todos los pacientes resultaron negativos por las técnicas parasitológicas. Sin embargo, tras la aplicación de la técnica PCR-rt-múltiplex 2 pacientes fueron positivos, uno de ellos positivo a *Strongyloides* spp. cuya muestra pretratamiento había sido positiva en el análisis en fresco, cultivo en agar y PCR-rt-múltiplex, y otro paciente positivo a una multiinfección por *Strongyloides* spp. y *Necator* spp., que únicamente había sido positivo por análisis en fresco tanto a *Strongyloides* spp. como a uncinarias. En 22 pacientes se consiguió realizar un segundo seguimiento a los 6 meses y se observó que todos ellos fueron negativos tanto por técnicas parasitológicas como moleculares.

4.2.5 Aplicación de la técnica PCR-rt-múltiplex en muestras de heces de población escolar en zona endémica: Angola.

La aplicación de la técnica PCR-rt-múltiplex se llevó a cabo en las muestras de heces descritas en el apartado 3.1.2.2. de Material y Métodos. Se analizaron un total de 100 muestras de heces de población infantil en edad escolar, entre 5 y 14 años, recogidas en las 4 comunas del municipio de Cubal: Yambala (n=25), Cubal (n=25), Capupa (n=25) y Tumbulo (n=25), en la provincia de Benguela cuyas características geográficas se describen en el apartado 3.2.2. de Material y Métodos. Participaron 48 niños y 52 niñas con una media de edad de 9,48 años y una mediana de 9,50. La información demográfica de la que dispusimos de la población analizada por comuna aparece recogida en las **Figuras 36 a 39**.

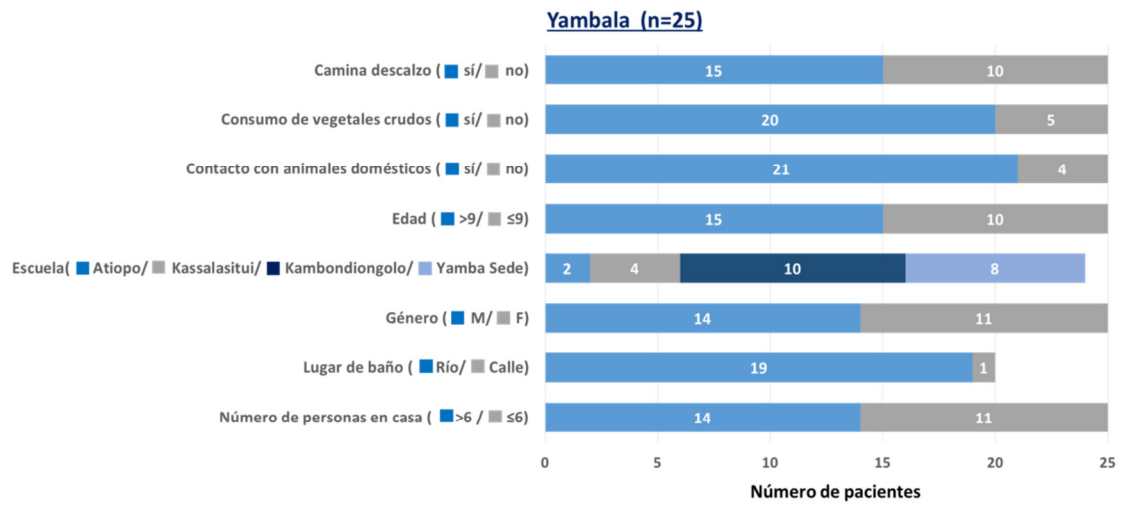


Figura 36. Información demográfica de los individuos reclutados en la comuna de Yambala (Benguela, Angola).

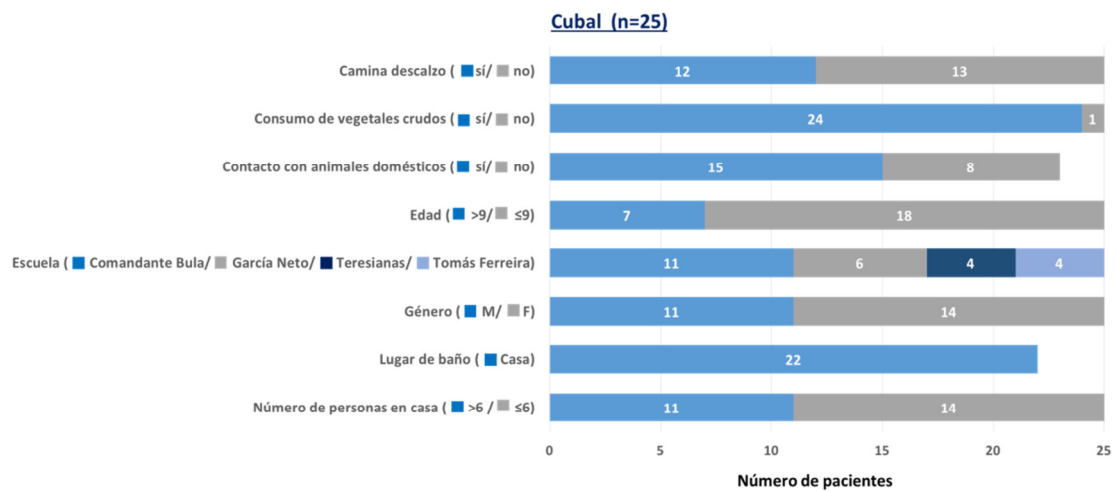


Figura 37. Información demográfica de los individuos reclutados en la comuna de Cubal (Benguela, Angola).

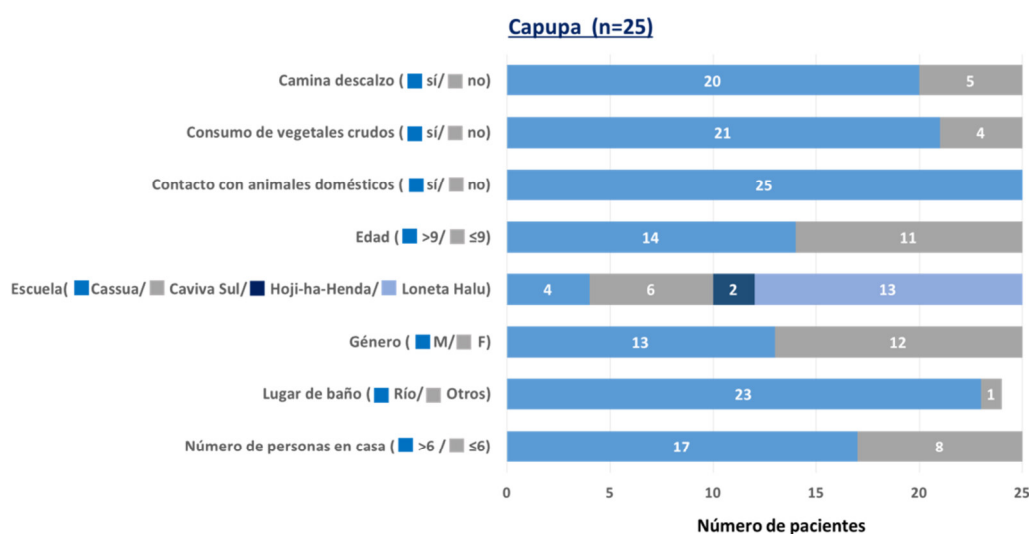


Figura 38. Información demográfica de los individuos reclutados en la comuna de Capupa (Benguela, Angola).

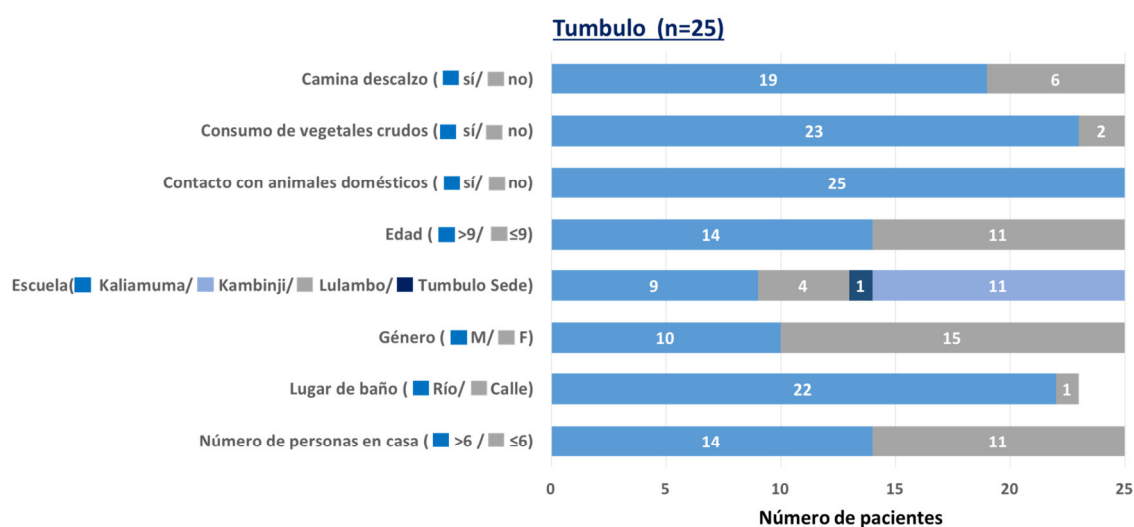


Figura 39. Información demográfica de los individuos reclutados en la comuna de Tumbulo (Benguela, Angola).

De las 100 muestras analizadas, 17 de ellas fueron positivas por PCR-rt-múltiplex para algún geohelminto: 5 fueron positivas para *Necator* spp., 1 para *Ascaris* spp. y 11 para *Strongyloides* spp., sin detectarse infecciones múltiples. Los resultados en términos de porcentaje aparecen recogidos en la **Tabla 24**.

			Porcentaje de positivos			
Variable		N	<i>Strongyloides</i> spp.	<i>Necator</i> spp.	<i>Ascaris</i> spp.	STHs
Global		100	11,00	5,00	1,00	17,00
Género	Masculino	48	10,42	4,17	2,08	16,67
	Femenino	52	11,54	5,78	0,00	17,31
Grupo de edad	5–9	50	6,00	6,00	2,00	14,00
	9–14	50	16,00	4,00	0,00	20,00
Comuna	Tumbulo	25	12,00	4,00	0,00	16,00
	Cubal	25	0,00	0,00	4,00	4,00
	Capupa	25	20,00	0,00	0,00	20,00
	Yambala	25	12,00	16,00	0,00	28,00

Tabla 24. Porcentaje de positivos por PCR-rt-múltiplex para cada geohelminto según género, edad y comuna.

Por comuna de estudio se detectaron en Tumbulo 3 positivos para *Strongyloides* spp., en Cubal 1 para *Ascaris* spp., en Capupa 5 para *Strongyloides* spp. y en Yambala 3 positivos para *Strongyloides* spp. y 5 positivos para *Necator* spp.

Al comparar los resultados moleculares con los obtenidos por métodos parasitológicos se observó que por las técnicas parasitológicas empleadas ninguna de las muestras fue positiva para *Trichuris* spp. no encontrándose positivos tampoco por la técnica de PCR-rt-múltiplex y que la única muestra positiva obtenida para *Ascaris* spp. por técnicas parasitológicas convencionales fue la positiva detectada por PCR-rt-múltiplex. Parasitológicamente, por observación microscópica directa, se encontraron 17 muestras positivas para uncinarias, de las cuales 5 fueron positivas para *Necator* spp. mediante PCR-rt-múltiplex. Por último, por la técnica de Baermann se encontraron 4 muestras positivas a *Strongyloides* spp. 3 de las cuales además fueron positivas por visualización microscópica directa y todas ellas por PCR-rt-múltiplex. Además, se detectaron 7 muestras positivas adicionales por ésta última técnica.

En la **Tabla 25** aparecen recogidos los valores de la probabilidad del riesgo relativo (PRR) para las diferentes variables estudiadas (género, grupo de edad, número de personas en casa, lugar de baño, contacto con animales domésticos, camina descalzo y consumo de vegetales crudos), no encontrándose diferencias significativas para ninguna de ellas. Sin embargo, cabe destacar la mayor presencia de geohelmintiasis en individuos mayores de 9 años y en los que caminan descalzos.

Variable (nº de observaciones perdidas)	Categoría	Casos ^a	No casos ^b	PRR	95% IC	p-valor
Género	Femenino	9	43	1,03	0,43-2,47	0,93
	Masculino	8	40	Ref.		
Grupo de edad	> 9 años	10	40	1,42	0,59-3,45	0,42
	≤ 9 años	7	43	Ref.		
Número de personas en casa (2)	> 6 individuos	6	43	0,70	0,28-1,79	0,46
	≤ 6 individuos	10	39	Ref.		
Lugar de baño (10)	Río	13	52	1,28	0,39-5,13	0,66
	Otros	4	21	Ref.		
Contacto con animales domésticos (2)	Sí	17	69	ND*	ND*	ND*
	No	0	12	Ref.		
Camina descalzo	Sí	14	52	2,40	0,74-7,79	0,12
	No	3	31	Ref.		
Consumo de vegetales crudos	Sí	17	71	ND*	ND*	ND*
	No	0	12	Ref.		

Tabla 25. Valores de riesgo relativo asociados a las variables de estudio. ^a: positiva PCR-rt-múltiplex para al menos un geohelminto de estudio y ^b: negativa PCR-rt-múltiplex. PRR: Probabilidad de Riesgo Relativo. *ND: no disponible debido al bajo número en alguna de las variables.

Con respecto a las manifestaciones clínicas, no se observaron diferencias significativas para ninguna de las variables mediante el cálculo de la probabilidad de *odds ratio* (POR), aunque existe una mayor presencia de geohelmintiasis en aquellos individuos que presentaron tos y prurito (**Tabla 26**).

Variable (nº de observaciones perdidas)	Categoría	Casos ^a	No casos ^b	POR	95% IC	p-valor
Tos (1)	Sí	8	47	1,50	0,52-4,45	0,44
	No	9	35	Ref.		
Dolor abdominal	Sí	6	41	0,57	0,18-1,67	0,29
	No	11	42	Ref.		
Vómitos/náuseas	Sí	2	11	0,92	0,12-4,00	0,87
	No	15	72	Ref.		
Lesiones cutáneas	Sí	1	8	0,66	0,02-4,07	0,62
	No	16	75	Ref.		
Prurito	Sí	6	24	1,35	0,41-4,03	0,60
	No	11	59	Ref.		

Tabla 26. Cálculo de la *odds ratio* de las variables clínico-analíticas. ^apositivo por PCR-rt-múltiplex para al menos un geohelminto de estudio y ^bnegativo por PCR-rt-múltiplex. POR: Probabilidad de *Odds Ratio*.

4.2.6. Aplicación de la técnica PCR-rt-múltiplex en muestras de heces de población general en zona endémica: Mozambique.

La aplicación de la técnica PCR-rt-múltiplex se llevó a cabo en las muestras de heces descritas en el apartado 3.1.2.2. de Material y Métodos. Se han analizado un total de 300 muestras de población general en Mozambique: 200 procedentes de la provincia de Maputo y 100 muestras de la provincia de Zambezia (área de estudio descrita en el apartado 3.2.4. de Material y Métodos).

Respecto a las 200 muestras procedentes de la provincia de Maputo del total de muestras analizadas 93 fueron positivas por PCR-rt-múltiplex para alguno de los geohelminthos. De las cuales, un 10,55% fue positiva para *Ascaris* spp., un 11,56% para *Strongyloides* spp., 38,19% para *Necator* spp. y un 5,53% para *Trichuris* spp., no encontrándose ningún positivo a *Ancylostoma* spp. Se hallaron además multiparasitaciones: en 9 pacientes se detectó *Necator* spp. y *Strongyloides* spp., en 3 pacientes *Necator* spp. y *Ascaris* spp. y en 1 paciente *Necator* spp. y *Trichuris* spp. En todas las muestras se realizaron técnicas parasitológicas consistentes en dos Kato-Katz y un Telleman, según aparece descrito en el apartado 3.3.1. de Material y Métodos, mediante las cuales se obtuvo un menor número de muestras positivas en comparación con la técnica de PCR-rt-múltiplex. Las proporciones de positivos y negativos obtenidos se reflejan en la **Tabla 27**.

Se construyeron las tablas de frecuencias 2 x 2 y se compararon mediante el índice Kappa los resultados de las técnicas parasitológicas con los obtenidos por la técnica

molecular de PCR-rt-múltiplex. Se obtuvo una concordancia insignificante o discreta en la mayoría de las comparaciones y una concordancia moderada para uncinarias y *Ascaris* spp. al realizar la comparación de PCR-rt-múltiplex y la técnica Telleman (**Tabla 27**).

Resultados parasitológicos y moleculares para <i>Ascaris</i> spp.										
		Kato-Katz 1		IKappa (95% IC) Concordancia	Kato-Katz 2		IKappa (95% IC) Concordancia	Telleman		IKappa (95% IC) Concordancia
		-	+		-	+		-	+	
PCR-rt-múltiplex	-	172	2	0,33 (0,10 a 0,57)	172	2	0,33 (0,10 a 0,57)	174	3	0,51 (0,29 a 0,72)
	+	15	5	Discreta	15	5	Discreta	12	9	Moderada

Resultados parasitológicos y moleculares para <i>Strongyloides</i> spp.										
		Kato-Katz 1		IKappa (95% IC) Concordancia	Kato-Katz 2		IKappa (95% IC) Concordancia	Telleman		IKappa (95% IC) Concordancia
		-	+		-	+		-	+	
PCR-rt-múltiplex	-	171	0	0	171	0	0,00	175	0	0,14 (-0,035 a 0,32)
	+	23	0	Sin acuerdo	23	0	Sin acuerdo	21	2	Insignificante

Resultados parasitológicos y moleculares para uncinarias										
		Kato-Katz 1		IKappa (95% IC) Concordancia	Kato-Katz 2		IKappa (95% IC) Concordancia	Telleman		IKappa (95% IC) Concordancia
		-	+		-	+		-	+	
PCR-rt-múltiplex	-	123	13	0,32 (0,18 a 0,46)	125	11	0,29 (0,14 a 0,43)	122	18	0,43 (0,29 a 0,57)
	+	36	22	Discreta	39	19	Discreta	27	31	Moderada

Resultados parasitológicos y moleculares para <i>Trichuris</i> spp.										
		Kato-Katz 1		IKappa (95% IC) Concordancia	Kato-Katz 2		IKappa (95% IC) Concordancia	Telleman		IKappa (95% IC) Concordancia
		-	+		-	+		-	+	
PCR-rt-múltiplex	-	177	6	0,07 (-0,13 a 0,27)	180	3	0,22 (-0,061 a 0,51)	182	5	0,19 (-0,075 a 0,45)
	+	10	1	Insignificante	9	2	Discreta	9	2	Insignificante

Tabla 27. Tablas de frecuencia 2x2 para los resultados obtenidos por técnicas parasitológicas y molecular de PCR-rt-múltiplex en las muestras de la provincia de Maputo (Mozambique).

Con respecto a las 100 muestras procedentes de 100 individuos de la provincia de Zambezia, 8 de ellos fueron positivos para geohelminfos por PCR-rt-múltiple, estando 7 de ellos monoparasitados y uno biparasitado. En cuanto a los que presentaron infección única, 1 individuo procedente de Mocuba lo fue para *Ancylostoma* spp., 1 de Lugela para *Strongyloides* spp. y 2 individuos, uno procedente de Gurúe y otro de Alto Molócue, fueron positivos para *Trichuris* spp. Por último, el distrito más afectado fue Quelimane que presentó un individuo positivo a *Strongyloides* spp., otro a *Ascaris* spp. y un tercero a *Necator* spp. Por último el individuo biparasitado por *Ascaris* spp. y *Necator* spp. también procedía de éste último distrito. En los distritos de Namacurra, Mopeia, Morrumbala, Ile y Nioadala no se detectaron casos de geohelmintiasis en la población general estudiada.

The background is a light cream color. A large, semi-transparent yellow diamond shape is positioned on the right side. Overlapping the left edge of this diamond is a large, vertically-oriented oval shape filled with a complex, repeating geometric pattern in shades of brown and tan. The pattern consists of various nested squares, diamonds, and lines.

5. Discusión

5. Discusión

Las geohelmintiasis son un grave problema de salud pública encabezando la lista elaborada por la OMS de las NTDs en cuanto a número de personas afectadas, tanto en edad infantil como adulta (Pullan *et al.*, 2014; De Vlas *et al.*, 2016; Weatherhead *et al.*, 2017). Sin embargo, este hecho no se refleja en el establecimiento de las medidas necesarias para su correcta detección y control. Las técnicas de diagnóstico para este conjunto de enfermedades se siguen apoyando en las técnicas parasitológicas convencionales (Barda *et al.*, 2013; Knopp *et al.*, 2014) y en algunos casos son las únicas disponibles. Este hecho repercute además en los programas de control dirigidos hacia estas parasitosis y no sólo en el caso de la estrongiloidiasis, donde los datos de prevalencia real son desconocidos y se carece de un programa de control específico o en conjunto con el resto de geohelmintiasis, sino que también hace que sea imprescindible la búsqueda de nuevas técnicas diagnósticas para una mejor evaluación de los programas de control ya establecidos. Debido a las similitudes existentes entre estos geohelminthos, la estrategia para el control de las enfermedades que producen debe hacerse de una forma integrada, tal como propone la OMS dentro del programa Horizonte 2020 (H2020). Sin embargo, la falta de sensibilidad y especificidad de las técnicas diagnósticas disponibles dificulta la consecución de los objetivos establecidos. El diagnóstico serológico para ascariasis, trichuriasis y uncinurias no parece tener una especial relevancia, como han venido aportando otros autores (Corripio *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2016; Leroux *et al.*, 2018) debido a la existencia de un gran número de reacciones cruzadas que dificultan la interpretación de los resultados (Norsyahida *et al.*, 2013). Sin embargo, en el caso de la estrongiloidiasis el desarrollo de las técnicas serológicas ha sido un pilar fundamental para el diagnóstico de esta parasitosis.

5.1. Diagnóstico serológico de la estrongiloidiasis

A diferencia de lo que ocurre en el resto de geohelmintiasis, para el diagnóstico serológico de la estrongiloidiasis se dispone de numerosos ensayos, principalmente en formato ELISA, muchos de ellos distribuidos además de forma comercial. A pesar de esto, el diagnóstico de esta enfermedad sigue siendo un problema debido a la baja especificidad y/o sensibilidad de las técnicas empleadas habitualmente y conlleva una ausencia de datos reales sobre el número de casos de estrongiloidiasis. A esto se une que no existe una técnica considerada como *gold standard* o de referencia (Krolewiecki *et al.*, 2013). Generalmente, las técnicas de diagnóstico parasitológico convencionales son poco sensibles y las que se utilizan de forma específica, como el Harada Mori, la técnica de Baermann o el cultivo en agar, son laboriosas y requieren de personal especializado. El diagnóstico molecular, aunque es más

específico y sensible, no siempre es de utilidad en esta enfermedad puesto que existe un gran número de pacientes en estado crónico, en cuyas muestras de heces es frecuente que la cantidad de ADN del parásito sea prácticamente indetectable.

Por este motivo, y tratando de aumentar la especificidad del diagnóstico serológico actual, en nuestro estudio hemos estandarizado un método ELISA que permite la determinación de las subclases de isotipos IgG1 e IgG4 y hemos puesto a punto un método de *Western Blot* frente a *Strongyloides* spp.

Es importante destacar que el análisis de muestras séricas puede verse rechazado por su naturaleza invasiva y que además numerosos autores han cuestionado la eficacia de las técnicas serológicas principalmente en dos grupos poblacionales: por un lado, en inmigrantes, debido a las características de esta población más expuesta a éstas y otras infecciones afines a lo largo de su vida, y por otro, en población inmunodeprimida, grupo considerado de alto riesgo por las características del parásito (Schaffel, 2001). Por este motivo, se ha analizado la eficiencia de nuestras técnicas en muestras de pacientes tanto inmigrantes como viajeros, con sospecha de padecer estrongiloidiasis, así como en muestras de individuos procedentes de zona endémica (Etiopía). Además, se ha comparado la aplicabilidad de estas técnicas en pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos.

En relación con los ensayos llevados a cabo en formato ELISA, la primera limitación a superar fue la obtención de antígeno de larvas L3 de *S. stercoralis* y su producción a gran escala debido a que el modelo animal disponible para esta especie es el canino y la manipulación de este tipo de larvas puede suponer un riesgo de infección para el personal implicado. Este hecho se solventó mediante la utilización de un antígeno heterólogo de *S. venezuelensis*, con un alto grado de homología con *S. stercoralis* (VAN Doorn *et al.*, 2007). La disponibilidad de este antígeno nos ha permitido desarrollar el protocolo de la técnica ELISA “*in house*” para la detección de IgG1 e IgG4. La titulación de los reactivos a través del formato de tablero de ajedrez, aunque no es el único, es un método eficaz que permite la combinación de todas las condiciones posibles enfrentando en cada ensayo dos de los componentes a titular y es el método más ampliamente utilizado. En todos los casos se utilizó el Ratio de Union (RU) como criterio para determinar las condiciones a utilizar en el protocolo ya que nos permite despreciar las uniones no específicas, siendo el valor de RU obtenido comparable entre todos los pocillos. La concentración de antígeno (5 ng/μl) así como las diluciones del suero (1/50) y conjugado (1/4000) seleccionadas para el ensayo de IgG1 y el de IgG4 fueron similares a las utilizadas por otros autores (Sultana *et al.*, 2012; Norsyahida *et al.*, 2013).

En cuanto a las condiciones de trabajo recogidas en la bibliografía, éstas son variadas. En el estudio de [Sultana et al. de 2012](#) las placas fueron sensibilizadas con 10 ng/ μ l de un extracto de larvas L3 de *S. ratti* y se añadió el suero diluido 1/100 para la determinación de IgG1 y 1/5 para IgG4, mientras que el anticuerpo conjugado se utilizó a una dilución 1/200 para IgG1 y a 1/20 para IgG4. Por otro lado, en el estudio de [Norsyahida et al. del año 2013](#), limitado a la detección de IgG4, la sensibilización de las placas fue en este caso con 10 ng/ μ l de larvas L3 de *S. stercoralis*, diluyendo los sueros a la dilución 1/100 y el conjugado de anticuerpo secundario a la dilución 1/4500. En ambos estudios, la concentración de antígeno utilizada fue del doble que la empleada en nuestro estudio y las diferencias existentes entre las condiciones establecidas para cada uno puede deberse a la distinta naturaleza del antígeno, así como de los anticuerpos secundarios conjugados empleados.

Por otro lado, en los dos estudios previamente mencionados, el valor de *cut off* se estimó mediante la ecuación de Dixon y Massey (1983): media de los negativos más 2 desviaciones estándar, en el estudio llevado a cabo por [Sultana et al. \(2012\)](#) y la media de los negativos más x desviaciones estándar en el trabajo de [Norsyahida et al. \(2013\)](#), correspondiendo x a los valores críticos para la distribución de t de Student para contraste de hipótesis según los grados de libertad y el valor de significancia considerado por los autores. Este tipo de aproximación no es del todo correcta puesto que las absorbancias de las muestras séricas negativas, utilizadas para el establecimiento de los puntos de corte, generalmente no siguen una distribución normal pudiendo generar una gran cantidad de falsos positivos. Para evitar este sesgo en el presente trabajo se han utilizado las curvas ROC, en cuya elaboración se incluyen tanto muestras de suero negativas como positivas. Las curvas ROC constituyen una herramienta fundamental en el proceso de evaluación y uso de las pruebas diagnósticas. Son una representación fácilmente comprensible de la capacidad de discriminación de la prueba en todo el rango de puntos de corte, además de ser simples, gráficas y fáciles de interpretar, y son por tanto un gráfico en el que se observan todos los pares sensibilidad/1-especificidad resultantes de la variación discreta de forma sucesiva de los puntos de corte en todo el rango de resultados obtenidos. El área bajo la curva nos da una medida global de la exactitud de una prueba diagnóstica, y nos permite clasificar correctamente a un individuo seleccionado al azar de la población, como sano o enfermo tras aplicarle la prueba diagnóstica ([Burgueño et al., 1995](#)). El uso de esta metodología nos ha permitido establecer los puntos de corte para la determinación de los índices de las subclases 1 y 4 de las inmunoglobulinas G en los ensayos de ELISA puestos a punto en este trabajo con gran exactitud. Sin embargo, a pesar de que tras el desarrollo de esta técnica conseguimos categorizar bien a los pacientes en positivos y negativos para cada subclase, el papel que juega cada inmunoglobulina sigue siendo

controvertido. El complejo ciclo de vida de *Strongyloides* spp., con numerosas fases de autoinfección hace que el estudio de la respuesta inmune frente a este parásito sea especialmente complejo, dificultando además la categorización de los pacientes en agudos y crónicos.

Los ensayos de validación de la técnica de ELISA para la detección de las subclases de isotipos IgG1 e IgG4 se llevaron a cabo en población inmigrante y viajera, donde la mayoría de los pacientes fueron inmigrantes reclutados en los hospitales del SNS español participantes en nuestro estudio. Destacó el elevado número de pacientes procedentes del continente americano y concretamente la alta presencia de bolivianos. A pesar de que las nacionalidades más frecuentes presentes en nuestro país son la rumana y la marroquí (RCE, 2019), esta mayor presencia de inmigrantes bolivianos en nuestro estudio puede deberse a que éstos acuden con una mayor frecuencia a los centros de salud como consecuencia de los programas de vigilancia establecidos dirigidos a la enfermedad de Chagas (Salvador *et al.*, 2019). En este sentido, es de destacar la reciente asociación descrita entre la detección en sangre periférica de *Trypanosoma cruzi*, parásito causante de la enfermedad de Chagas, y pacientes con estrongiloidiasis (Puerta-Alcalde *et al.*, 2018; Salvador *et al.*, 2017). Por otro lado, la mayor representación de los inmigrantes africanos la encontramos en Guinea Ecuatorial (27,27%), consecuencia de que al haber sido colonia española las relaciones entre ambos países son más frecuentes que con otros del mismo continente (Salvador *et al.*, 2019).

En referencia a los antecedentes clínico-analíticos evaluados en los individuos en estudio destacó la alta presencia de eosinofilia, hallada en un 57,69% (105/182) de los pacientes reclutados, seguido también de una IgE elevada en un 37,24% (54/154). Estos resultados están en concordancia con los descritos por otros autores (Salvador *et al.*, 2014; Ramirez-Olivencia *et al.*, 2014), aunque en un estudio recientemente publicado de revisión de los casos de estrongiloidiasis reportados en España, los autores encontraron una mayor asociación con la eosinofilia ya que subrayan que 41 de los 50 pacientes de estrongiloidiasis (82%) que proporcionaron sangre presentaron eosinofilia (Barroso *et al.*, 2019). De las manifestaciones clínicas presentadas destacó el dolor abdominal difuso en un 22,10% de los casos (40/181) y la epigastralgia en un 19,38% (31/160), estando en una menor proporción la aparición de *larva currens* y de urticaria, siendo estas manifestaciones dérmicas las que están directamente relacionadas con la entrada reciente del parásito o con ciclos recientes de autoinfección (Tamarozzi *et al.*, 2019; Zubrinich *et al.*, 2019).

Desde el punto de vista laboratorial, a todos estos pacientes se les realizaron dos técnicas serológicas indirectas (ELISA-IgG-IVD y ELISA-IgG1/IgG4) a partir de las muestras de

suero, y tres técnicas de detección directa del parásito a partir de las muestras de heces recogidas, que consistieron en la visualización microscópica tras tres exámenes en fresco, cultivo en agar y PCR-rt-*Strongyloides* spp. utilizando *SybrGreen* como intercalante. La positividad en cualquiera de estas tres técnicas, ELISA-IgG IVD y/o examen en fresco y/o cultivo en agar, se utilizó como criterio de inclusión de los pacientes. Al evaluar la presencia de las subclases de isotipos IgG1 e IgG4 por la técnica ELISA desarrollada, se observó que existía una mayor presencia de la subclase IgG1 (30/171) frente la subclase 4 (16/171). Al comparar los valores de los índices obtenidos por el método ELISA-IgG IVD y por la determinación de las subclases mediante la correlación de Pearson, el coeficiente obtenido demostró que la mayor correlación existente fue la que presentaron los resultados de ELISA-IgG IVD y de ELISA-IgG1. Sin embargo, la correlación entre los índices de ELISA-IgG IVD y ELISA-IgG4 mostró una correlación baja (0,32), aunque superior a la obtenida por Norsyahida *et al.* en su estudio publicado en el año 2013, en la que se determinó ésta en 0,0042. La baja correlación existente entre las subclases de isotipos IgG1 e IgG4 de 0,42 fue similar a las correlaciones de 0,54 y de 0,20 obtenidas en los dos únicos estudios publicados ([Rodrigues *et al.*, 2007](#); [Sultana *et al.*, 2012](#)). Esto sugiere que, en la dinámica de la respuesta inmune frente a esta parasitosis, la coexistencia de ambas subclases no es continua ni se mantiene durante un tiempo prolongado.

Las distribuciones de los resultados de las técnicas empleadas en el estudio corroboraron la existencia de diferencias altamente significativas entre los valores de índices obtenidos por el kit de ELISA-IgG IVD en el total de pacientes y en pacientes tanto positivos como negativos por la técnica de detección de subclases de isotipos de inmunoglobulinas G1 y G4. De hecho se obtuvieron diferencias altamente significativas entre los valores de ELISA-IgG IVD del total de pacientes y los que presentaron índices positivos para ELISA-IgG1 y diferencias muy significativas entre los valores de ELISA-IgG IVD del total de pacientes y los que presentaron índices negativos para ELISA-IgG1. Las diferencias fueron altamente significativas entre los valores de ELISA-IgG IVD del total de pacientes y los que presentaron índices positivos para ELISA-IgG4 y diferencias muy significativas entre los valores de ELISA-IgG IVD del total de pacientes y los que presentaron índices negativos para ELISA-IgG4. Además, se pudo observar que en aquellos individuos que fueron positivos por la técnica de detección de subclases, tanto IgG1 como IgG4, los valores de índice por el kit comercial fueron significativamente más elevados. Por otro lado, no encontramos diferencias significativas entre los resultados de los índices obtenidos por las técnicas ELISA-IgG IVD, ELISA-IgG1 y ELISA-IgG4 para pacientes positivos y negativos por PCR-rt-*Strongyloides* spp.,

cuestionando así la utilidad de la técnica molecular en la discriminación de los pacientes que en su mayoría, al ser inmigrantes, son considerados crónicos y pueden o no estar expulsando larvas en sus heces. En estos resultados también se observó que los pacientes positivos por la técnica molecular presentaron los valores de índices más elevados, hecho especialmente destacado en el caso de la detección de la subclase de inmunoglobulinas G1. Previamente, otros autores han cuestionado la utilidad de las técnicas directas, principalmente parasitológicas, en la detección de casos de individuos crónicos fuera de zona endémica, debido principalmente a que la expulsión de larvas es de forma intermitente, tal y como aparece reflejado en el artículo de [Buonfrate et al. \(2015\)](#). En este trabajo, se recoge la mejor aproximación diagnóstica en diferentes situaciones, con estudios de prevalencia en zona endémica, diagnóstico de casos individuales, cribado y evaluación de cura, y se sugiere que el tipo de técnicas apropiadas para el diagnóstico individual de casos crónicos son las serológicas por su alta sensibilidad. Sin embargo, en casos de hiperinfección, debido a la inmunosupresión, la cantidad de larvas expulsadas es mayor consiguiéndose una mejora de la sensibilidad de las técnicas directas ([Buonfrate et al., 2015](#)).

Por otro lado, tras evaluar de forma cualitativa mediante tablas de frecuencia 2 x 2 y el cálculo del índice Kappa, los resultados obtenidos mostraron una mayor concordancia entre los resultados de la subclase IgG4 y PCR-rt-*Strongyloides* spp. El conjunto de estos resultados sugiere que hay una mayor asociación de la subclase IgG1 con los resultados obtenidos por el ELISA-IgG IVD, mientras que la determinación de la subclase IgG4 podría estar más relacionada con la detección del parásito en heces mediante técnicas moleculares. Este resultado concuerda con lo encontrado por otros autores ([Atkins et al., 1997](#); [Rodrigues et al., 2007](#)) que asocian a la subclase 4 de inmunoglobulinas G con infecciones activas o más recientes y con una mayor presencia del parásito en heces. Dado que en nuestro estudio, los pacientes podrían ser considerados crónicos puesto que la gran mayoría (91,76 %) son inmigrantes residentes en España, en teoría sin contacto reciente con zona endémica, la presencia de IgG4 podría sugerir que en estos pacientes se están produciendo nuevos ciclos de auto-infección en el interior del hospedador. En nuestro país, aunque la zona de Levante fue considerada endémica ([Cremades Romero et al., 1997](#); [Sanchez et al., 2001](#); [Martinez-Perez y Lopez-Velez, 2015](#)), en la actualidad no está demostrada la existencia de transmisión activa de la enfermedad ([Barroso et al., 2019](#)), siendo lo más probable por tanto que estos pacientes sean crónicos o con una infección no reciente. Aún así, esta supuesta cronicidad podría considerarse relativa ya que no podemos asegurar si han realizado un viaje reciente a su país de origen o a otra zona considerada endémica, sin olvidar además la posibilidad de

autoinfección en la estrongiloidiasis. No obstante, tal y como hemos observado, en nuestras muestras de pacientes inmigrantes la mayor presencia de IgG1 frente a IgG4 nos llevaría a pensar que la subclase 1 perdura más a lo largo del tiempo de infección. Esta mayor permanencia durante la infección de la respuesta por IgG1 ha sido descrita previamente por [Sultana et al. \(2012\)](#), pero este punto genera controversia ya que otros autores han asociado la presencia de la subclase 4 de inmunoglobulinas G a infecciones crónicas ([Norsyahida et al., 2019](#)). Nuestros resultados sugieren que ambas subclases de inmunoglobulinas (G1 y G4) están presentes en individuos crónicos, pero que la presencia de la subclase 4 está relacionada con ciclos de autoinfección, donde la expulsión de larvas y por tanto su detección por técnicas directas es mayor.

La principal motivación para el desarrollo de un ensayo ELISA, que permitiera la detección de diferentes subclases de isotipos de inmunoglobulinas frente a *Strongyloides* spp., fue la mejora de la especificidad frente a las técnicas comerciales descritas puesto que una de las principales desventajas de las técnicas serológicas disponibles para la detección de helmintos es la elevada aparición de reacciones cruzadas. En este sentido, se categorizaron los valores de los índices obtenidos por el kit IgG ELISA IVD en las muestras séricas en cuatro grupos (índices entre 1 y 2; entre 2 y 3; entre 3 y 4; y mayores de 4) y se observó que el mayor número de positivos por el ELISA de subclases de isotipos se encontró en el grupo que tenía un valor de índice por el kit comercial mayor de 4. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que el mayor número de valores discordantes se encontraron en aquellos sueros que presentaron índices bajos, especialmente los pertenecientes al grupo con valores de índice entre 1 y 2. En este caso, no podemos plantear el aumentar el valor de *cut off* establecido para las técnicas comerciales puesto que también encontramos pacientes positivos por subclases de isotipos y confirmados por técnicas directas (parasitológicas y/o moleculares) que presentaron un índice entre 1 y 2 por el ELISA-IgG IVD. Este hecho es especialmente característico de esta infección y se debe a que tal y como hemos visto, no todos los pacientes con un valor de índice similar se comportan de la misma manera o pertenecen al mismo estatus, ya que los anticuerpos detectados podrían deberse a anticuerpos residuales, reacciones cruzadas, infecciones tempranas o a autoinfecciones. Por tanto, en estos pacientes se debería considerar solicitar nuevas muestras de suero en un período de tiempo posterior para observar su evolución y conseguir una mejor interpretación de los resultados. Los resultados obtenidos por los métodos directos de PCR-rt-*Strongyloides* spp. y técnicas parasitológicas en la misma población previamente estudiada por técnicas serológicas vienen a confirmar la mayor especificidad de la detección de las subclases. Sin

embargo, en este estudio la concordancia insignificante obtenida tras la comparación de las diferentes técnicas, y la no existencia de una técnica *gold standard*, hace necesaria para la comparación la utilización de una combinación de técnicas dependiendo del origen del paciente y del estatus en el que se encuentre, y no nos ha permitido establecer un criterio claro de técnicas a utilizar. Evidentemente hay que destacar el papel que las técnicas serológicas han desempeñado en el diagnóstico de nuestra población inmigrante en estudio, por lo que sería recomendable que en el diagnóstico de estrongiloidiasis en este tipo de pacientes se primara la sensibilidad frente a la especificidad aplicando técnicas serológicas frente a técnicas de detección directa. Más aún, la alta presencia del parásito detectado en las muestras analizadas y la carencia en la actualidad de un programa de cribado real y consensuado de la estrongiloidiasis pone de manifiesto la necesidad de implementar un programa de control de esta parasitosis, sin olvidar además la existencia de las condiciones adecuadas para su transmisión en la zona de Levante. En esta zona del este de nuestro país nos encontramos con que el 20,6% de la población inmigrante del total de España reside en las provincias costeras de Cataluña, el 13,3% en la Comunidad Autónoma de Valencia, el 4,1% en la Región de Murcia y el 3,2% en la provincia de Almería ([RCE, 2019](#)), lo que podría facilitar la aparición de brotes y la posible notificación de transmisión activa en nuestro país.

En otro sentido es interesante destacar que de los 15 pacientes viajeros incluidos en el estudio todos ellos fueron positivos serológicamente por el test comercial ELISA-IgG IVD con índices entre 1,14 y 7,28 y únicamente uno de ellos lo fue por la técnica ELISA-IgG4, sin detectarse la presencia de anticuerpos anti-IgG1. Sin embargo, al realizar las técnicas directas todos fueron negativos para el análisis en fresco, pero un 40% (6/15) fue positivo por PCR-rt-*Strongyloides* spp. A pesar de que el número de viajeros ha sido bajo, el elevado porcentaje de positivos obtenidos apoya la necesidad de realizar, tal y como apuntan otros autores, un cribado sistemático a aquellos que regresan de países de alta endemicidad ([Angheben et al., 2011](#)) y de sospechar de la presencia de esta parasitosis en pacientes con eosinofilia o sintomatología compatible que provienen de zona endémica ([Gonzalez et al., 2010](#); [Ramirez-Olivencia et al., 2014](#)).

En el contexto actual, cabría preguntarse si estas técnicas serológicas son útiles en individuos inmunodeprimidos, ya que su utilidad en este perfil de pacientes está siendo cada vez más cuestionada. Los resultados obtenidos nos demuestran que los pacientes inmunodeprimidos incluidos en nuestro estudio, cuando se comparan con los pacientes inmunocompetentes analizados, muestran diferencias muy significativas en los valores de los índices obtenidos por el ELISA-IgG IVD y por el ELISA-IgG1 pero no para la subclase 4. La aplicación de técnicas serológicas para el diagnóstico en individuos inmunodeprimidos

debería de ser analizada de forma más específica ya que, debido a la gran mortalidad que la presencia del parásito puede producir en estos pacientes, un resultado negativo obtenido por técnicas serológicas requeriría confirmación con técnicas moleculares de detección directa, más sensibles que las parasitológicas. Las infecciones por VIH o por HTLV-1, en un 16,48% y en un 1,10% de los pacientes respectivamente, han sido identificadas como importantes factores de riesgo en la estrongiloidiasis (Ahmadpour *et al.*, 2019). La aplicación del método ELISA-IgG IVD en este grupo de inmunodeprimidos reveló anticuerpos anti-IgG totales en el 90% de los pacientes con el virus VIH y en el 100% de los que padecían HTLV-1, mientras que la determinación de las subclases 1 y/o 4 fue positiva para el 32,14% de los pacientes con VIH. Asimismo, uno de los pacientes con HTLV-1 presentó anticuerpos frente a la subclase 4 y el otro, que también había sufrido una neoplasia, tan solo a la subclase 1. Además, dichos resultados presentaron una gran concordancia con los obtenidos molecularmente donde el 38,46% de los pacientes inmunoprimidos por el virus VIH fueron positivos por PCR-rt-*Strongyloides* spp., y en cuanto a los pacientes con HTLV-1, aquel que presentó anticuerpos frente a la subclase 4 rindió un resultado positivo por PCR-rt-*Strongyloides* spp. y técnicas parasitológicas, y no así en el otro paciente positivo tan sólo a la subclase 1, que fue negativo a todas las técnicas directas.

Entre los pacientes inmunodeprimidos por otras causas, como fueron padecer una enfermedad autoinmune, sufrir neoplasia, estar sometido a un protocolo de transplante o a un tratamiento crónico con corticoides, un 83,33% de ellos (15/18) fueron positivos por la técnica ELISA-IgG IVD y se obtuvo un mayor número de positivos por la técnica de ELISA-IgG1/IgG4 que por la técnica molecular de PCR-rt-*Strongyloides* spp. Es de destacar que en aquellos pacientes que habían sufrido una enfermedad autoinmune la aplicación de los protocolos serológicos y moleculares no se apreciaron diferencias en la proporción de positivos (60,00% y 55,55% respectivamente). Por ello, podemos afirmar que en los pacientes positivos a los virus VIH y HTLV-1, y en el resto de inmunodeprimidos por otras causas, el diagnóstico serológico mediante las técnicas de ELISA-IgG IVD y de determinación de subclases de isotipos en combinación con la técnica molecular de PCR-rt-*Strongyloides* spp. nos ha permitido realizar un diagnóstico más correcto, seguro y fiable de la estrongiloidiasis. Sin embargo, para obtener una mejor significancia de los resultados sería necesario evaluar un mayor número de pacientes inmunodeprimidos, especialmente individuos con serología positiva al virus HTLV-1.

Con respecto a la utilidad del análisis de las subclases de isotipos para el seguimiento de la eficacia del tratamiento, se evaluó la presencia de las mismas en la población inmigrante y viajera después de ser tratada siguiendo los protocolos establecidos en los

correspondientes hospitales donde fueron atendidos. De nuevo la subclase mayoritariamente detectada en los pacientes tratados tras el análisis a los 6 meses post-tratamiento fue la 1, lo que confirmaría nuestra sospecha de que no solo es la subclase que mayor tiempo perdura en la infección, sino que al menos permanece elevada durante el periodo de seguimiento de los pacientes. En referencia a la subclase 4, en nuestros resultados obtuvimos diferencias altamente significativas entre los valores de los índices para este tipo de inmunoglobulina antes y después del tratamiento, por lo que la determinación de IgG4 podría ser una buena herramienta de evaluación de cura. Ya algunos autores han tratado de asociar la presencia de la subclase 4 de las inmunoglobulinas con fallo terapéutico (Sato *et al.*, 1999) y por otro lado, otros investigadores también han descrito niveles altos de IgG4 en pacientes tratados en zona endémica que estarían expuestos a reinfecciones y que además fueron tratados con albendazol, fármaco de baja eficacia en el tratamiento de la estrongiloidiasis (Henriquez-Camacho *et al.*, 2016). Estos factores estarían ausentes en nuestro trabajo, por la imposibilidad de reinfección en nuestro país y por el uso en los hospitales participantes de la ivermectina en los protocolos de tratamiento de estos pacientes, fármaco actual de elección para el tratamiento de la estrongiloidiasis (Buonfrate *et al.*, 2019).

En los pacientes inmunodeprimidos incluidos en nuestra población inmigrante y viajera estudiada también encontramos diferencias altamente significativas en los valores de los índices obtenidos por la técnica ELISA-IgG IVD antes y después del tratamiento, haciendo también de esta técnica comercial un excelente candidato para el seguimiento de los pacientes tratados.

No obstante intentamos abordar el seguimiento post-tratamiento de una población en zona endémica en la región de Amhara, en Etiopía, donde a pesar de que los estudios publicados no sitúan a la estrongiloidiasis a la cabeza de las geohelminCIAS, o en su mayoría ni la mencionan (Abdi *et al.*, 2017) (Nute *et al.*, 2018) (Leta *et al.*, 2018), en un reciente estudio llevado a cabo por Amor *et al.* (2016) se describió en población infantil una prevalencia del 20,7%. Etiopía presenta condiciones de posibilidad de reinfección por continuo riesgo de contacto con el parásito, con una población infantil con gran desnutrición y por tanto desfavorecida inmunitariamente y observamos que la respuesta a las subclases de isotipos IgG1 e IgG4 es discordante con lo encontrado a nivel molecular, con un 50% de positivos detectados por la técnica PCR-rt-*Strongyloides* spp. frente a un 10% por el ensayo ELISA-IgG1 e IgG4. Este hecho junto con la ausencia de datos pretratamiento, limitante de nuestro trabajo, nos lleva a la necesidad de plantearnos la aplicación de las técnicas serológicas y moleculares en la misma población antes y después del tratamiento para poder

responder de forma fiable tanto a la dinámica de la respuesta como a la utilidad de las técnicas serológicas en población endémica.

Por otro lado, algunos autores han descrito una competencia entre los niveles séricos de las inmunoglobulinas IgG4 e IgE (Arifin *et al.*, 2019). Sin embargo, tras la aplicación de la técnica ELISA-IgG4 en los individuos inmigrantes o viajeros analizados, hemos podido observar que esta competencia entre IgG4 e IgE pudiera no ser tan marcada ya que 54 de 145 pacientes (37,24%) presentaron una IgE elevada y de éstos 54, 26 (48,15%) fueron positivos para IgG4. Además, su condición de inmigrantes que residen en España y por tanto considerados crónicos, nos ha llevado a cuestionar si esta modulación tiene lugar también en este tipo de pacientes. También, está descrito que la subclase de inmunoglobulina G que más perdura durante la infección es la 1 (Sultana *et al.*, 2012). Sin embargo, nuestros resultados apuntan a que habría un punto en el que coexistirían las subclases 1 y 4, ya que de los 26 pacientes que resultaron positivos a IgG4, 18 también lo fueron a IgG1. La condición de pacientes crónicos en los que pueden tener lugar ciclos de autoinfección podría ser una explicación a la aparición simultánea de IgE, IgG1 e IgG4.

Por último, de acuerdo a la dinámica de las inmunoglobulinas obtenidas en los pacientes estudiados podríamos diferenciar a los individuos crónicos en dos categorías: crónico con un proceso de autoinfección (IgE elevada y resultado positivo a ELISA-IgG1/IgG4); y crónico sin autoinfección (menor elevación de IgE y resultado positivo a ELISA-IgG1), teniendo en cuenta que también hemos encontrado pacientes con una IgE elevada pero con un resultado negativo por las técnicas serológicas específicas. Es importante reseñar que las determinaciones de IgE realizadas no detectan IgE específicas anti-*Strongyloides* spp., sino IgE totales, pudiendo deberse sus niveles elevados a otros motivos como reacciones alérgicas, infecciones por otros patógenos, etc. (Jarret *et al.*, 1982; Arifin *et al.*, 2019). Por tanto sería interesante y necesario determinar la presencia de IgE específica frente a *Strongyloides* spp. y tratar de correlacionarla con las diferentes subclases (1 y 4) de inmunoglobulinas G y además, para poder entender mejor la dinámica de las inmunoglobulinas sería conveniente ampliar el estudio a un grupo de población con primoinfección e incluir un examen inmunológico más exhaustivo con el estudio de las poblaciones de citoquinas y sus niveles, tal y como sugieren otros autores (Anuradha *et al.*, 2015).

En lo referente a la técnica de *Western Blot*, ésta ha sido también utilizada en el diagnóstico inmunológico de la estrongiloidiasis, presentando unos altos valores de especificidad y sensibilidad (Conway *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2003; Corral *et al.*, 2017). No obstante, su utilización es menos frecuente y en un ámbito más restringido que la técnica ELISA, debido principalmente a la laboriosidad del protocolo y a la dificultad de obtención del

material antigénico, lo que la ha relegado a centros de investigación y/o de referencia. Además, para una mejor interpretación de los resultados obtenidos mediante esta tecnología se hace imprescindible y necesario la optimización y homogeneización de los protocolos utilizados y el establecimiento de un protocolo consenso que unifique los actualmente existentes ([Andreetta et al., 2019](#)). La gran variabilidad de los patrones de reconocimiento y del peso molecular de las proteínas reconocidas puede deberse a múltiples factores como son entre otros: i) perfil de la población en estudio; ii) fuente de antígeno, homólogo o heterólogo, empleada; y iii) método de preparación del extracto proteico antigénico.

En nuestro caso, el ensayo de *Western Blot* se ha llevado a cabo utilizando 150 µg de un extracto proteico de *S. venezuelensis*, destacando un reconocimiento en forma de *smear* de 27-41 kDa en los sueros de pacientes parasitológicamente confirmados. Así, en la gran mayoría (76,18%) de los sueros de pacientes con serología positiva por la técnica comercial ELISA-IgG IVD se reconocieron proteínas dentro de esa franja y en 19 de ellos (45,24%) en forma de *smear*. Además, dichas bandas no fueron reconocidas por los sueros de individuos donantes negativos o de pacientes diagnosticados con otras helmintiasis, mientras que sí se apreció un patrón de reconocimiento de bandas de alto peso molecular en individuos donantes y de 45 a 70 kDa en pacientes con otras helmintiasis. Es importante comentar que los pacientes con serología positiva por ELISA-IgG IVD con índices comprendidos entre 1 y 2 presentaron un patrón de reconocimiento incluyendo bandas de alto peso molecular, presentes en el grupo de individuos sanos donantes y por tanto inespecíficas, y que en menos de un 25%, 10 de los 42 pacientes analizados que presentaron serología positiva a *Strongyloides* spp. por ELISA-IgG IVD presentaron un patrón de bandas (45-70 kDa) característico del grupo de pacientes con serología positiva a otras helmintiasis.

Previamente, otros autores han destacado la reactividad con proteínas de 28, 31, 41 y 205 kDa ([Uparanukraw et al., 1999](#)), 41, 31 y 28 kDa ([Lindo et al., 1994](#)) ([Conway et al., 1994](#)) 96, 86, 41 y 32 kDa ([Siddiqui et al., 1997](#)), 29, 30, 31, 33, 33.5, 36, 44 y 56 kDa ([Atkins et al., 1999](#)) y 26 kDa ([Sudré et al., 2007](#)), aunque nuestros resultados están más en concordancia a los obtenidos en el estudio de [Silva et al. \(2003\)](#), los cuales utilizaron como antígeno una fracción soluble de *S. ratti* y donde se visualizó con mayor frecuencia un *smear* de 28-35 kDa en pacientes con estrongiloidiasis, no presente en pacientes con otras parasitosis intestinales ni en individuos sanos. Estos autores no describieron la reactividad frente a proteínas de 41 kDa encontradas en nuestro estudio, hecho que pone de manifiesto las posibles diferencias antigénicas entre las diferentes especies empleadas como fuente de antígeno y/o a los diferentes procedimientos de extracción proteica utilizados ([Silva et al., 2003](#)). Sin embargo en el estudio llevado a cabo por [Corral et al. \(2017\)](#) en el que se utiliza

como antígeno heterólogo un extracto proteico de *S. venezuelensis*, al igual que nosotros, identificaron en el 50% de los sueros de pacientes con presencia de larvas en sus heces un *smear* de 35-40 kDa, resultados también similares a los obtenidos por otros autores que emplearon la misma fuente antigénica (Machado *et al.*, 2008; Gonzaga *et al.*, 2011), de manera que los resultados obtenidos en este trabajo, apoyados por lo publicado previamente por otros autores, confirman el alto valor diagnóstico del complejo proteico entre 27 y 41 kDa.

5.2. Diagnóstico molecular de las geohelmintiasis

La presencia de los geohelminthos está asociada principalmente a determinadas condiciones socioambientales comunes para todos ellos, por lo que no es extraño la aparición de coinfecciones en individuos de zona endémica. Es en estas zonas donde las técnicas parasitológicas tienen un uso más extendido, especialmente la técnica de Kato-Katz, recomendada por la OMS por su bajo coste *a priori* en comparación con el resto de métodos disponibles. Sin embargo, estas técnicas no permiten la detección simultánea y correcta de los cinco geohelminthos, con importantes limitaciones para la detección de larvas, por lo que su aplicación estaría subestimando de la prevalencia de *Strongyloides* spp. Es por tanto necesario, en este escenario, el desarrollo de técnicas de detección múltiple con elevada especificidad. Con este fin hemos desarrollado una técnica de diagnóstico molecular, basada en un método de PCR en tiempo real en formato múltiplex (PCR-rt-múltiplex), para la detección de ADN de estos cinco parásitos de forma simultánea, en una sola reacción y a partir de una única muestra de heces. Tras la validación de dicha técnica, en población inmigrante y viajera con sospecha de padecer geohelmintiasis, se aplicó en diferentes poblaciones de zona endémica, en concreto en población infantil en Angola y en población general en Mozambique.

Para su optimización se dispuso de material biológico de las diferentes formas parasitarias de cada geohelmintho de interés, que nos permitió evaluar y optimizar uno de los puntos más importantes y crucial en los ensayos de PCR, como es la extracción de ADN a partir de las muestras de heces en las mejores condiciones para su amplificación. Se seleccionó el protocolo de extracción que mejor rendimiento proporcionó. Tal y como está descrito en la literatura, la rotura de los huevos de *A. lumbricoides* (Amoah *et al.*, 2019; Ayana *et al.*, 2019) y *T. trichiura* (Kaisar *et al.*, 2017) es especialmente complicada por su compleja estructura, por lo que nos centramos en dichos estadios parasitarios. Partiendo del material disponible se contaminó una muestra de heces de un donante negativo con huevos de estos dos parásitos y se procedió a la utilización de diferentes kits comerciales de

extracción (*QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit*, *Speedtools tissue DNA extraction Kit*, *Favorprep Stool DNA Isolation Mini Kit* y *PowerSoil DNA Isolation Kit*), ya utilizados previamente por otros autores en ensayos de PCR ([Nilforoushan et al., 2007](#); [Sultana et al., 2013](#)). Debido a que el material parasitario en ocasiones es escaso y no se encuentra distribuido de forma homogénea en las muestras de heces, éstas fueron concentradas previamente utilizando únicamente solución salina con el fin de impedir la inhibición de la técnica PCR, como puede suceder en otros métodos de concentración que utilizan formol y éter ([Truant et al., 1981](#)). El protocolo que arrojó mejores resultados en términos de cantidad y calidad de ADN obtenido fue el kit *Favorprep Stool DNA Isolation Mini Kit* que incluye la utilización de bolas de vidrio de diferentes tamaños para la lisis del material parasitario presente en las heces; sin embargo, en la evaluación en términos de amplificación de los ADNs obtenidos por los diferentes métodos fue el kit *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* el que rindió los mejores resultados. De hecho, este kit de extracción de ADN a partir de muestras de heces es el más ampliamente utilizado por distintos grupos de investigación ([Ayana et al., 2019](#)), y también se ha publicado su uso con ligeras modificaciones, como la adición de un paso de incubación a 95°C durante 10 minutos al inicio del protocolo ([Saugar et al., 2015](#)). Además, para la detección de *T. trichiura*, varios estudios han sugerido la incorporación de un paso extra de rotura con bolas de vidrio ([Andersen et al. 2013](#); [Demeler et al. 2013](#); [Liu et al. 2013](#); [Platts-Mills et al. 2014](#); [Easton et al. 2016](#)) y en el estudio realizado por [Mejia et al. \(2013\)](#) se propone también añadir un paso de calentamiento y de centrifugación. Por todo ello, se decidió escoger el kit *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* como método de extracción de ADN para las muestras concentradas de heces con sospecha de padecer geohelmintiasis añadiendo un paso previo de agitación con bolas de vidrio de diferentes tamaños seguida de una incubación a 95 °C durante 10 minutos.

Actualmente la bibliografía recoge múltiples variantes del método de PCR pero entre ellos destaca el formato en tiempo real, ya que presenta numerosas ventajas frente al método de PCR convencional como una mayor sensibilidad, especificidad, reproductibilidad y disminución del riesgo de contaminación y del tiempo de emisión del resultado ([Espy, 2006](#)). Dentro de los protocolos de PCR en tiempo real que pretenden conseguir además una detección múltiple de patógenos predominan aquellos que utilizan sondas de hidrólisis con diferentes fluorocromos (sondas *TaqMan*®) para la detección de múltiples dianas en una única reacción. Por este motivo y basándonos en literatura existente decidimos sintetizar las sondas y *primers* correspondientes a fragmentos diana de diferentes tamaños de las regiones ITS-1, ITS-2 y 18S rDNA para la detección de forma simultánea de *Ascaris* spp., *Trichuris* spp.,

Necator spp., *Ancylostoma* spp. y *Strongyloides* spp., genes ampliamente utilizados en diagnóstico molecular (Verweij *et al.*, 2007; Basuni *et al.*, 2011; Mejia *et al.*, 2013; Knopp *et al.*, 2014; Gordon *et al.*, 2015; Llewellyn *et al.*, 2016). Algunos autores han utilizado la tecnología MGB (*Minor Groove Binding*) en las sondas con el fin de aumentar la Tm de las mismas, lo que permite el uso de sondas más cortas ofreciendo una discriminación más precisa (Llewellyn *et al.*, 2016). En nuestro trabajo se reemplazó el uso de la tecnología MGB en las sondas para *Ancylostoma* spp., *Necator* spp. y *Trichuris* spp. por la inserción de LNAs (*Locked Nucleic Acids*), tecnología que permite el mismo incremento de la Tm y que reduce notablemente el coste de producción de las sondas.

Un primer paso para la puesta a punto de cada ensayo de PCR de forma individual para cada geohelminto consistió en comprobar la eficacia de las diferentes condiciones establecidas y determinar el límite de detección para cada especie de interés, estableciéndose en 0,10 pg para todos ellos, resultado en algunos casos superior a los obtenidos por otros autores para *A. lumbricoides*, *N. americanus* y *S. stercoralis* (Sanprasert *et al.*, 2019) y en otros inferior para *A. lumbricoides*, *A. duodenale*, *S. stercoralis* y *T. trichiura* (Mejia *et al.*, 2013; Pilotte *et al.*, 2016). Estas discrepancias posiblemente fueron debidas a las diferencias metodológicas existentes entre los diferentes estudios.

Una vez optimizado el protocolo de PCR de forma individual se procedió a la puesta a punto de la técnica PCR-rt en formato múltiplex. Se realizó un ensayo preliminar de evaluación de la técnica PCR-rt múltiplex en muestras procedentes del Hospital Universitario Severo Ochoa de Leganés, lo que nos permitió verificar la amplificación del ADN de los geohelminthos en estudio a partir de muestras de heces de 65 pacientes con sospecha de padecer geohelmintiasis, incluyendo la detección de infecciones múltiples. Más del 10 % de las muestras analizadas fueron positivas para al menos un geohelminto y un 2,06% de las muestras presentaron coinfecciones por 2 geohelminthos diferentes, una positiva para *Strongyloides* spp. junto con *Trichuris* spp. y otra para *Trichuris* spp. junto con *Ascaris* spp., todas ellas provenientes de pacientes africanos. Además, se identificaron todas las especies objeto de esta PCR, excepto *Ancylostoma* spp. que no se detectó en ninguno de los pacientes analizados. En África, a pesar de que los estudios de geohelminthos son escasos y generalmente en ellos se utilizan técnicas parasitológicas que no permiten diferenciar las especies de uncinarias, se han reportado en algunas zonas en las que se han realizado estudios aplicando técnicas moleculares mayores prevalencias de *Necator* spp. que de *Ancylostoma* spp. (Verweij *et al.*, 2007; Cunningham *et al.*, 2018). Por ello, aunque el 93,33%

de los individuos analizados (56 de 65 pacientes) eran africanos, el tamaño de nuestra población podría justificar la ausencia de detección de *Ancylostoma* spp.

Con el fin de completar la evaluación de la metodología e intentar obtener una fotografía del panorama epidemiológico de las geohelmintiasis en nuestro país, debido al fenómeno de migración existente, se consiguió reclutar a 122 pacientes, inmigrantes o viajeros, con datos clínicos, analíticos y laboratoriales de sospecha de padecer geohelmintiasis en diferentes hospitales del SNS. Es de destacar que 2 de los 3 hospitales participantes estaban localizados en Cataluña, que tal y como mencionamos anteriormente acoge a un 20,6% de la población extranjera residente en España, y el tercer hospital estaba ubicado en Almería, que presenta el 3,2% de dicha población ([RCE, 2019](#)). En relación al Hospital de Poniente-El Ejido, situado en la costa almeriense, éste tiene una alta experiencia en el cribado de inmigrantes de forma protocolizada ([Salas-Coronas et al., 2018](#)), al igual que en Cataluña donde diferentes investigadores han realizado numerosos estudios de estrongiloidiasis ([Gonzalez et al., 2010](#); [Salvador et al., 2013](#)). En cuanto al país de origen de los pacientes inmigrantes reclutados el mayoritario fue Bolivia seguido de Guinea Ecuatorial, al igual que ocurría con las muestras recibidas para el ensayo de validación de la técnica de ELISA para la detección de las subclases IgG1 e IgG4 anti-*Strongyloides* spp. Sin embargo, en esta parte del estudio, destacó la presencia de un 11% de pacientes de origen asiático, principalmente procedentes de Bangladesh y Pakistán, todos ellos reclutados en los hospitales barceloneses. Este hecho se constata por la alta frecuencia de inmigrantes asiáticos que recibe Cataluña, y más concretamente la ciudad de Barcelona, en la que las nacionalidades china y paquistaní son la segunda y tercera más frecuentes ([Ayuntamiento de Barcelona](#)).

En referencia a los parámetros analíticos evaluados en esta población, destacó la alta presencia de eosinofilia, tanto absoluta como relativa, en su mayoría de tipo leve. En este sentido, en una revisión reciente de los casos de estrongiloidiasis en nuestro país se recogió que el 80,2% de los pacientes con sospecha de enfermedad presentó eosinofilia ([Salvador et al., 2019](#)). Por otro lado, en nuestro estudio se detectó una IgE elevada en un 58,18% (32/55) de los pacientes analizados y un valor de hemoglobina por debajo de 12 g/dl en un 17,21% (21/122). La alta presencia de eosinofilia y de IgE elevada, así como la disminución del valor de la hemoglobina ha sido descrita por otros autores en numerosas ocasiones como consecuencia de las infecciones por geohelminths, siendo especialmente característica la anemia en las infecciones por uncinarias ([Iborra et al., 2009](#)). Tras analizar los datos clínicos de los pacientes incluidos en nuestro estudio destacan las manifestaciones gastrointestinales

en un 15,57% (19/122) de los mismos, acorde con lo descrito por otros autores en otros países (Bethony *et al.*, 2006; Puthiyakunnon *et al.*, 2014). Sin embargo, en una reciente revisión realizada también en España, los síntomas gastrointestinales fueron motivo de consulta únicamente en el 8,4% de los pacientes, mientras que las alteraciones analíticas lo fueron en un 41,1% de los pacientes (Salvador *et al.*, 2019).

Los resultados obtenidos mediante la técnica PCR-rt-múltiplex mostraron que 30 de los 122 pacientes estaban monoparasitados siendo el parásito mayoritario *Strongyloides* spp. (26/30), seguido por *Ascaris* spp. (2/30), *Ancylostoma* spp. (1/30) y *Necator* spp. (1/30). En referencia a las coinfecciones, tres pacientes estaban biparasitados, uno por *Ascaris* spp. y *Strongyloides* spp., otro por *Ancylostoma* spp. y *Strongyloides* spp., y un tercero por *Necator* spp. y *Strongyloides* spp. Es de destacar que los dos pacientes positivos para *Ancylostoma* spp., uno en forma de monoparasitación y el otro de biparasitación, procedían del continente americano, en concreto de El Salvador y Bolivia; mientras que el origen de los dos pacientes positivos para *Necator* spp. fueron Honduras y Nigeria, de acuerdo con lo obtenido tanto en nuestro ensayo preliminar a partir de las muestras de heces de pacientes reclutados en el Hospital Universitario Severo Ochoa de Leganés como en estudios realizados por otros autores en diferentes países (Verweij *et al.*, 2007; Cunningham *et al.*, 2018). Por otro lado, los pacientes positivos a *Ascaris* spp. procedían únicamente del continente africano mientras que la presencia de *Strongyloides* spp. se encuentra representada de forma similar tanto en pacientes africanos como americanos y en una menor proporción en asiáticos. A pesar de que las tasas de infección reportadas para la estrongiloidiasis son heterogéneas dependiendo de la zona estudiada (Schar *et al.*, 2013), nuestros resultados demuestran que la presencia de este parásito en población inmigrante de nuestro país es más elevada de lo publicado hasta el momento, si bien en estudios serológicos se reportan seroprevalencias más elevadas a lo descrito en nuestro estudio por técnicas moleculares (Salvador *et al.*, 2013; Monge-Maillo *et al.*, 2015; Barroso *et al.*, 2019). Sin embargo, en concordancia con nuestros resultados destaca un estudio llevado a cabo en el Hospital de Poniente-El Ejido (Almería) sobre la presencia de enfermedades infecciosas en población inmigrante procedente de África subsahariana, América latina, Magreb y el este de Europa. En dicho estudio, el mayor número de casos de geohelmintiasis se detectó en aquellos pacientes procedentes de África subsahariana, siendo *S. stercoralis* el más prevalente, con un 22,4% de pacientes con larvas en heces. En los pacientes procedentes de América latina se detectaron casos de ascariasis, tricuriasis y estrongiloidiasis, siendo esta última la más común de las tres; en pacientes del Magreb se reportaron casos de uncinariasis y estrongiloidiasis y en los individuos

procedentes del este de Europa únicamente de ascariasis (Cobo *et al.*, 2016). A pesar de que vemos una tendencia a un menor número de casos de estrongiloidiasis en pacientes de países asiáticos donde existen condiciones favorables para su transmisión (Schar *et al.*, 2013), es cierto que la población asiática es la menos representada en nuestra muestra.

El hecho de que los resultados obtenidos mediante la técnica molecular de amplificación del ADN parasitario muestren a *Strongyloides* spp. como el parásito mayoritario concuerda con los datos proporcionados tras aplicarse las técnicas parasitológicas, en las que éste también fue el parásito mayoritariamente detectado tanto por el análisis en fresco como por cultivo en agar.

Por otro lado, es de destacar que tras comparar los resultados obtenidos por la técnica parasitológica de análisis en fresco y la molecular por PCR-rt-múltiplex, obtuvimos que de los 29 pacientes parasitológicamente positivos para *Strongyloides* spp., únicamente 5 se confirmaron por PCR mientras que 6 fueron positivos para *Ancylostoma* spp. La facilidad de los huevos de uncinarias para eclosionar a temperatura ambiente en un breve período de tiempo da lugar a larvas que pueden ser, en ocasiones, confundibles con el mismo estadio de *Strongyloides* spp. (Muller, 2002), hecho que podría ser una explicación de esta discordancia entre los resultados obtenidos por ambas técnicas. Sin embargo, no podemos descartar la existencia de coinfecciones no detectadas. Por otra parte, es importante señalar que la población estudiada es en su mayoría población inmigrante que probablemente se encuentre en un estado crónico de la enfermedad dificultando la detección tanto por técnicas parasitológicas como moleculares de los parásitos en las heces. De hecho, tal y como hemos visto también en nuestro estudio, en lo relativo a la detección de *Ascaris* spp. sólo 3 de los 6 pacientes positivos por análisis en fresco lo fueron por la técnica PCR-rt-múltiplex, de los 5 positivos por análisis en fresco para *Trichuris* spp., únicamente se pudo realizar la técnica PCR-rt-múltiplex en una muestra resultando ésta negativa y de los 10 positivos por análisis en fresco para uncinarias, solamente 2 fueron positivos a *Necator* spp. por PCR-rt-múltiplex. Este hecho justifica la necesidad de utilizar, en este perfil de pacientes, la combinación de técnicas con el fin de aumentar la sensibilidad diagnóstica de las mismas.

Paralelamente, tras el análisis estadístico de los resultados en cuanto a los parámetros clínico-analíticos recogidos de los pacientes se observó que, aunque en ningún caso de forma significativa, al aplicar únicamente las técnicas parasitológicas, existía una mayor proporción de positivos a geohelminthos en aquellos pacientes que presentaban manifestaciones gastrointestinales y cutáneas, y/o una elevada eosinofilia y/o una

hemoglobina mayor de 12 g/dl. Sin embargo, al analizar los datos obtenidos con la PCR-rt-múltiplex, tanto individualmente como en combinación con las técnicas parasitológicas, obtuvimos una mayor proporción de casos de geohelmintiasis en aquellos individuos que presentaban eosinofilia, una elevada IgE y una hemoglobina por debajo de 12 g/dl, pasando las manifestaciones gastrointestinales y cutáneas a un segundo plano. En relación con esto, es posible que la presencia de manifestaciones gastrointestinales se pueda relacionar con episodios agudos de la infección, correspondiendo éstos a su vez con una mayor expulsión de parásitos.

Por último, los 52 pacientes positivos por técnicas parasitológicas fueron sometidos a tratamiento siguiendo los protocolos establecidos en cada hospital participante y tres meses después del tratamiento se consiguió realizar el seguimiento en 26 pacientes, resultando todos ellos negativos por técnicas parasitológicas. Sin embargo, 2 pacientes resultaron positivos por PCR-rt-múltiplex, uno de ellos a *Strongyloides* spp. y otro por coinfección a *Strongyloides* spp. y *Necator* spp. Algunos autores sugieren que en el caso de la estrongiloidiasis es posible detectar el parásito hasta un año después del tratamiento debido a un fenómeno de reactivación ([Repetto et al., 2018](#)). Sin embargo, en nuestro estudio fue posible realizar un segundo seguimiento en 22 de estos pacientes a los 6 meses y se pudo comprobar que tras este tiempo en todos los pacientes las técnicas parasitológicas y la molecular de PCR-rt-múltiplex fueron negativas, acorde también a lo propuesto en otros estudios ([Bisoffi et al., 2011](#); [Buonfrate et al., 2019](#)). Nuestros resultados revelan que para la evaluación de la eficacia del tratamiento y el seguimiento de los pacientes la técnica PCR-rt-múltiplex fue más sensible que las técnicas parasitológicas aplicadas.

A continuación, se llevó a cabo la aplicación de la técnica PCR-rt-múltiplex para el diagnóstico de geohelmintiasis en tres poblaciones de dos zonas consideradas endémicas. En primer lugar se aplicó en población infantil, en 100 niños de edades comprendidas entre 5 y 14 años procedentes de diferentes comunas de la provincia de Benguela, en Angola. Mediante la técnica PCR-rt-múltiplex, se detectó un 17% (17/100) de niños positivos a geohelmintiasis, destacando la alta presencia de *Strongyloides* spp. (11/100) seguida de *Necator* spp. (5/100) y de *Ascaris* spp. (1/100), sin detectarse infecciones múltiples. La comuna que presentó una menor presencia de parásitos fue Cubal, donde los 25 niños analizados disponían de cuarto de baño en casa, lo que podría ser un signo de encontrarse en unas mejores condiciones sociosanitarias que el resto de niños de las otras comunas estudiadas. No obstante, estos resultados difieren de lo publicado por nuestro grupo en el año 2018 donde obtuvimos en esta comuna, en la misma población, una prevalencia de

Strongyloides spp. cercana al 30% al utilizar la técnica de PCR-rt-*Strongyloides* spp. (Dacal et al., 2018). La discrepancia entre los resultados para *Strongyloides* spp., tras utilizar ambas técnicas de diagnóstico molecular, puede deberse a que probablemente la técnica PCR-rt-*Strongyloides* spp., orientada a la detección de una única especie, sea más sensible que la PCR-rt-múltiplex en la que se detectan los 5 geohelminthos simultáneamente. Además, durante el tiempo de almacenamiento de las muestras entre la realización de ambas técnicas se ha podido producir un deterioro del ADN, propiciando una menor detección de *Strongyloides* spp. en la técnica que se realizó con posterioridad, en este caso la PCR-rt-múltiplex.

Por otra parte, en nuestro trabajo las dos comunas en las que mayor número de parásitos se han encontrado han sido Yambala y Capupa, ambas ubicadas en la zona sur del municipio de Cubal. Estas muestras a su vez fueron procesadas por dos técnicas parasitológicas, análisis en fresco y la técnica de Baermann, detectándose mediante análisis en fresco 1 positiva para *Ascaris* spp., 3 para *Strongyloides* spp. y destacando que 17 fueron positivas para uncinarias. Tras la realización de la técnica de Baermann obtuvimos 4 muestras positivas a *Strongyloides* spp. Todas las muestras positivas para *Strongyloides* spp. por técnicas parasitológicas se confirmaron por la técnica PCR-rt-múltiplex. Sin embargo, de las muestras positivas para uncinarias únicamente 5 lo fueron para *Necator* spp. y ninguna para *Ancylostoma* spp. mediante la técnica PCR-rt-múltiplex. Esta discrepancia en la detección de uncinarias puede deberse principalmente a un retraso en el procesamiento de las muestras a la hora de aplicar las técnicas moleculares y dado que los huevos de uncinarias son muy lábiles, podría dificultarse la detección de estos parásitos de forma molecular por un bajo rendimiento de un ADN óptimo. Sorprendentemente, es de resaltar que recientemente se ha publicado un estudio en el que se menciona la existencia de un parásito denominado *Ternidens deminutus* que coloquialmente se le conoce como la “falsa uncinaria” por la similitud de los huevos entre ambos, por lo que también podríamos explicar parte de esta falta de concordancia entre las técnicas parasitológicas y moleculares por una falsa positividad en los resultados obtenidos por microscopía (Bradbury, 2019). Sería interesante disponer de herramientas moleculares que nos permitieran realizar el diagnóstico diferencial de uncinarias y *T. deminutus*. Es de mencionar que en este estudio no encontramos niños positivos a *Trichuris* spp. y aunque no existen numerosos estudios acerca de la presencia de geohelmintiasis en este país, tanto en el realizado en una escuela de la ciudad de Lubango por Oliveira et al. (2015) como en el llevado a cabo en el Hospital General de Bengo por Gasparinho et al. (2016) se detectó en ambos por microscopía en mayor o menor medida la

presencia de este parásito. La ausencia de los parásitos *Trichuris* spp y *Ancylostoma* spp. y además la baja carga que obtuvimos para *Ascaris* spp. en las muestras estudiadas podría ser debida al método de extracción utilizado, ya que al pertenecer estas muestras a un estudio previo para la detección únicamente de *Strongyloides* spp. (Dacal et al., 2018), el protocolo de obtención de ADN utilizado no incluyó el paso previo de lisis con bolas de vidrio optimizado para la extracción de ADN de todos los geohelminthos. Esto ha podido suponer un obstáculo en la detección molecular de ambos parásitos presentes en estadio de huevo en las muestras de heces. De hecho, el parásito más frecuente en un estudio publicado recientemente en Angola donde se analizan muestras de población infantil fue *Trichuris* spp. con un 9%, detectándose una prevalencia global de geohelminthos del 17,9% (Lemos et al., 2019).

En referencia a la información demográfica y epidemiológica recogida, más de la mitad de la población estudiada (66%; 66/100) caminaba descalza, un 87,76% (86/98) tenía contacto con animales domésticos y un 88% (88/100) consumía vegetales crudos, factores fundamentales descritos en la transmisión de las geohelminthiasis (Brooker et al., 2004). El análisis de los posibles factores de riesgo y manifestaciones clínicas apunta, aunque no de forma significativa, a la existencia de un mayor riesgo de padecer geohelminthiasis en aquellos individuos que caminan descalzos, son mayores de 9 años y manifiestan tos y prurito. Estos factores los encontramos de forma más frecuente en nuestra población asociados a la presencia de *Necator* spp. y de *Strongyloides* spp., como ya se ha descrito anteriormente (Bird et al., 2014; Ngui et al., 2015; Halwindi et al., 2017).

Siguiendo la misma metodología, la técnica desarrollada fue aplicada para el diagnóstico de geohelminthiasis en otra zona endémica africana, en concreto en dos focos geográficos, Maputo y Zambezia, de Mozambique. Se analizaron un total de 300 individuos correspondientes a población general adulta, 200 de ellos procedentes de la provincia de Maputo, y 100 de Zambezia. En la provincia de Maputo se detectó la presencia de al menos algún geohelmintho en un 46,5% (93/200). El parásito detectado mayoritariamente fue *Necator* spp. seguido de *Strongyloides* spp., *Ascaris* spp. y *Trichuris* spp. Aunque los datos de prevalencia de uncinarias en Mozambique publicados por Augusto et al. (2009) y Meurs et al. (2017) son muy similares a los obtenidos por nosotros, la presencia de *A. lumbricoides* y *Trichuris* spp. reportada por dichos autores fue mucho mayor que la que encontramos en nuestro estudio. En este sentido es importante destacar que la población analizada por Augusto et al. (2009) pertenecía a la edad infantil, donde está descrito que estos dos parásitos son más prevalentes, mientras que en el trabajo de Meurs et al. (2017) se analizó

población adulta de una zona muy concreta de la provincia de Beira. Además, destacar que aunque en nuestro estudio encontramos un 86,02% de los casos positivos a un solo geohelminto, detectamos hasta un 13,98% de coinfecciones, principalmente biparasitaciones por *Necator* spp. y *Strongyloides* spp., seguido de *Necator* spp. y *Ascaris* spp. y de *Necator* spp. y *Trichuris* spp., dato más elevado que el obtenido por dichos investigadores ([Augusto et al., 2009](#); [Meurs et al., 2017](#)).

Dado que en todas las muestras se realizaron técnicas parasitológicas, dos Kato-Katz y un Telleman, se pudo llevar a cabo la comparación de los resultados parasitológicos con los obtenidos por la técnica molecular observando una mayor detección de todos los parásitos por la técnica PCR-rt-múltiplex. En el caso de *Ascaris* spp. el porcentaje de positivos por las técnicas parasitológicas fue menor o igual al 5%, sin embargo al utilizar la técnica molecular éste se duplicó (10,05%; 20/199) cuando dicha técnica se comparó con el Kato-Katz. Este hecho es aún más remarcable en el caso de *Strongyloides* spp., donde únicamente se detectaron dos pacientes positivos, un 1,01%, por la técnica de Telleman mientras que utilizando la técnica PCR-rt-múltiplex se alcanzó un 11,56% de positivos. También en el caso de uncinariasis obtuvimos un porcentaje mayor de positivos por PCR-rt-múltiplex, con un 38,19% para *Necator* spp. mientras que por técnicas parasitológicas tan solo se alcanzó un 24,74% de pacientes positivos tras la aplicación de la técnica de Telleman. Por último y aunque en menor porcentaje también se obtuvo un 5,53% de pacientes positivos para *Trichuris* spp. utilizando la técnica molecular mientras que por técnicas parasitológicas se consiguió detectar el 3,54%. Aún así, los datos de prevalencia obtenidos mediante las técnicas parasitológicas fueron superiores a los descritos por microscopía en un estudio realizado en el mismo distrito de Manhíça ([Mandomando et al., 2007](#)). La mayor discrepancia la obtuvimos entre los métodos parasitológicos y los moleculares en los resultados de detección de *Strongyloides* spp., lo que se podría considerar coherente ya que la sensibilidad de las dos técnicas parasitológicas utilizadas es baja y en concreto la técnica de Kato-Katz no es útil para la detección de larvas. Por otro lado, y al igual que ocurrió en el estudio llevado a cabo en Angola, en esta población no se detectó la presencia de *Ancylostoma* spp., pero en este estudio sí se realizó la inclusión en el método de extracción del paso de lisis con bolas de vidrio de diferentes tamaños y la incubación previa a 95 °C durante 10 minutos, lo que posiblemente nos permitió una mayor detección de *Ascaris* spp. y *Trichuris* spp. a diferencia de lo obtenido en el estudio realizado en Angola donde únicamente una muestra fue positiva para *Ascaris* spp. y ninguna para *Trichuris* spp.

Con respecto a la otra provincia de Mozambique analizada, Zambezia, en el análisis de 100 individuos de población general únicamente en 8 de ellos (8%) se detectó la presencia de geohelminths y, destacando que en uno de ellos, por PCR-rt-múltiplex, se detectó *Ancylostoma* spp. El 87,5% de los casos respondieron a monoparasitaciones (2 positivos a *Strongyloides* spp., 2 positivos a *Trichuris* spp., 1 positivo a *Ancylostoma* spp., 1 positivo a *Necator* spp., y 1 positivo a *Ascaris* spp.) y el 12,5% a una coinfección por *Ascaris* spp. y *Necator* spp. El distrito de Quelimane, capital y ciudad más grande dentro de Zambezia, situado en la región costera oriental del país, fue el que englobó el mayor porcentaje de casos de geohelmintiasis acorde con los resultados obtenidos por [Augusto et al. \(2009\)](#), aunque nuestros datos revelan en general una menor presencia de los geohelminths en dicha zona en comparación con este estudio donde las prevalencias obtenidas son mayores.

Aunque es cierto que encontramos más frecuentemente las coinfecciones por dos parásitos en todas las poblaciones estudiadas mediante la técnica PCR-rt-múltiplex, la monoparasitación sigue siendo la forma más recurrente. Los estudios epidemiológicos realizados en geohelmintiasis hacen referencia a la ascariasis seguido de las uncinariasis como las parasitosis más frecuentes; sin embargo, en nuestro estudio observamos una mayor presencia de estrongiloidiasis tanto en pacientes inmigrantes como en aquellos que residen en las dos zonas endémicas africanas evaluadas (Angola y Mozambique). Este hecho tiene sentido ya que en la bibliografía disponible existen pocos estudios de estrongiloidiasis que utilicen las técnicas adecuadas para su detección. Las discordancias obtenidas entre los resultados parasitológicos y moleculares nos hace plantearnos que el trabajo de campo presenta numerosas limitaciones en cuanto al correcto y adecuado almacenamiento de las muestras y el tiempo de procesamiento de éstas dado las condiciones e infraestructuras propias de estas zonas, que nos impiden abordar de una forma óptima el diagnóstico molecular de estas enfermedades. Además, en el caso de la estrongiloidiasis esta limitación no sólo afecta a las técnicas moleculares sino que las técnicas parasitológicas adecuadas para el correcto diagnóstico de esta geohelmintiasis requieren unas determinadas condiciones que las hacen de difícil ejecución en los trabajos de campo, principalmente la necesidad de realizar el análisis de muestras de heces frescas mediante Baermann, cultivo en agar y Harada Mori para permitir la viabilidad de las larvas.

Actualmente, existen diferentes plataformas e instituciones, tanto públicas como privadas, que muestran un gran interés en el control de estas enfermedades, ya que además su propia presencia contribuye a la perpetuación de la pobreza, en contra del primero de los 17 Objetivos incluidos en la Agenda de Desarrollo Sostenible de la ONU que es precisamente el

fin de la misma. Todo apunta a que el control de las enfermedades tropicales desatendidas y en especial las geohelminCIAS debe ser abordado desde una perspectiva multidimensional y bajo el prisma de la iniciativa de *One Health* que propone un enfoque común a la salud humana, animal y ambiental. Por tanto, conocer la prevalencia real de estas enfermedades es el indicador clave para la selección de las medidas de control adecuadas y ésto solo se puede llevar a cabo utilizando un correcto diagnóstico e implementando programas de administración masiva de fármacos. Así, de nuevo se hace imprescindible la utilización de herramientas altamente sensibles y específicas que permitan evaluar la respuesta a estos programas, sin olvidar las acciones de mejora de las condiciones ambientales y la reducción de las prácticas de riesgo asociadas a estas enfermedades. Es por ello que en nuestro trabajo se han querido evaluar las herramientas diagnósticas desarrolladas serológicas y moleculares no solo desde el punto de vista diagnóstico sino también de control post-tratamiento, puesto que cada vez se hacen más imprescindibles métodos más sensibles y específicos que sean capaces de detectar las bajas cargas parasitarias en las poblaciones sometidas a tratamiento antihelmíntico.



6. Conclusiones

6. Conclusiones

1. El empleo de un antígeno heteorólogo de *S. venezuelensis* como fuente antigénica, ha permitido el desarrollo de un método ELISA para la determinación de inmunoglobulinas de las subclases G1 y G4 y de un ensayo de *Western Blot* para el diagnóstico de la estrongiloidiasis. Si bien la técnica comercial ELISA IgG-IVD es una excelente herramienta para el cribado de la estrongiloidiasis, un correcto diagnóstico de casos implica la utilización de diferentes técnicas serológicas complementarias y el método ELISA para la detección de IgG1 e IgG4 mejora la interpretación de los resultados que por ELISA IgG-IVD rinden valores de índice entre 1 y 2, y el reconocimiento por *Western Blot* del complejo proteico de 27 a 41 KDa es confirmatorio por su alto valor diagnóstico.
2. En nuestro estudio la mayor detección de inmunoglobulinas de la subclase G1 se obtuvo al analizar la población inmigrante, pudiendo coexistir con la subclase G4, mientras que en la población viajera IgG1 no fue detectada. Nuestros resultados sugieren que la subclase G1 perdura más a lo largo del tiempo y la presencia de la subclase G4 puede estar relacionada con ciclos de autoinfección, ya que tras el análisis cualitativo y cálculo del índice Kappa la presencia de IgG4 está relacionada con la detección del parásito en heces mediante la técnica de PCR-rt *Strongyloides* spp.
3. En los pacientes incluidos en nuestro estudio, inmigrantes y viajeros, de acuerdo a los datos analíticos y laboratoriales obtenidos podemos diferenciar dos patrones: i) IgE elevada y resultado positivo por ELISA IgG1/IgG4 se relacionaría con un paciente crónico con un proceso de autoinfección, y ii) una menor elevación de IgE y un resultado positivo por ELISA IgG1 con un paciente crónico sin ciclos de autoinfección. No obstante, sería necesario realizar nuevos estudios con un mayor número de individuos viajeros y con diferentes perfiles para un mejor conocimiento de la dinámica de las subclases de inmunoglobulinas G1 y G4.
4. El elevado porcentaje de resultados positivos obtenidos en pacientes viajeros apoya la necesidad de realizar un cribado sistemático a aquellos que regresan de países de alta endemicidad y de sospechar de la presencia de esta parasitosis en pacientes que provienen de zona endémica con eosinofilia o sintomatología compatible.

5. En los pacientes incluidos en nuestro estudio con estrongiloidiasis e inmunodeprimidos, por la presencia de los virus VIH y HTLV-1 u otras causas de inmunosupresión, la combinación de las técnicas serológicas de ELISA IgG-IVD y de determinación de subclases de isotipos junto con la técnica molecular de PCR-rt *Strongyloides* spp. ha permitido realizar un diagnóstico correcto, seguro y fiable de la enfermedad en este tipo de pacientes.

6. Tanto para los pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos en la población inmigrante y viajera estudiada, las diferencias altamente significativas en los valores de índice obtenidos por ELISA IgG-IVD y ELISA IgG1/G4, antes y después del tratamiento, hacen de estas técnicas unas candidatas excelentes para el seguimiento de los pacientes tratados, siendo la subclase mayoritariamente detectada en los pacientes tras 6 meses post-tratamiento la G1 y no así la subclase G4.

7. La optimización de un protocolo de extracción de ADN para las muestras concentradas de heces de pacientes con sospecha de presencia de *Ascaris* spp., *Trichuris* spp., *Necator* spp., *Ancylostoma* spp. y *Strongyloides* spp., incluyendo un paso de agitación con bolas de vidrio de diferentes tamaños seguido de una incubación a 95 °C durante 10 minutos, previo al empleo del kit QIAamp Fast DNA Stool, ha sido un punto clave para conseguir una mayor eficacia en la rotura de los huevos de *Ascaris* spp. y *Trichuris* spp. y en consecuencia un mayor rendimiento en el aislamiento de ADN de dichos estadios parasitarios de compleja estructura.

8. Se ha desarrollado una técnica de PCR en tiempo real (PCR-rt) para la detección de forma individual de *Ascaris* spp., *Trichuris* spp., *Necator* spp., *Ancylostoma* spp. y *Strongyloides* spp. y de forma conjunta de los cinco geohelminthos en estudio (PCR-rt-múltiplex). La aplicación de la técnica PCR-rt-múltiplex por primera vez en nuestro país en muestras de heces de inmigrantes y viajeros y en poblaciones de zonas endémicas de África ha permitido el diagnóstico de geohelmintiasis únicas y de multi-infecciones por dos o más geohelminthos.

9. Los resultados obtenidos por la técnica PCR-rt-múltiplex en pacientes con geohelmintiasis, antes y después de ser tratados, revelan que este método es una alternativa eficaz para la evaluación de la eficacia del tratamiento a los 3 y 6 meses post-tratamiento, siendo más sensible que las técnicas parasitológicas convencionales aplicadas para la detección de los geohelminthos.

10. *Strongyloides* spp. ha sido el geohelminto mayoritariamente detectado en las poblaciones inmigrante y viajera de nuestro país e infantil de Angola analizadas, y tras las ucinarias en la población general de Mozambique, hecho que confirma la sospecha de subestimación de esta parasitosis y la necesidad de establecer programas de control específicos para ella.

11. La aplicación de la técnica PCR-rt-múltiplex en población infantil y comunitaria de zonas endémicas africanas, Angola y Mozambique ha puesto de manifiesto una elevada discordancia entre los resultados parasitológicos y moleculares obtenidos, planteando que el trabajo de campo presenta numerosas limitaciones en cuanto al almacenamiento de las muestras a analizar y en el tiempo de procesamiento de éstas dado las condiciones e infraestructuras propias de estas zonas, las cuales dificultan abordar de una forma óptima el diagnóstico molecular de estas enfermedades.

12. Como resultado de este trabajo, la técnica ELISA para la determinación de las subclases de isotipos IgG1 e IgG4 se ha incorporado en la Cartera de Servicios del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III para los hospitales del SNS y la técnica PCR-rt-múltiplex para el diagnóstico de geohelminthos actualmente se encuentra en proceso de inclusión.



7. Bibliografía

7. Bibliografía

- Abdi M, Nibret E, and Munshea A. Prevalence of intestinal helminthic infections and malnutrition among schoolchildren of the Zegie Peninsula, northwestern Ethiopia. *J.Infect.Public Health*. 2017; 10(1):84-92.
- Adu-Gyasi D, Asante KP, Frempong MT, Gyasi DK, Iddrisu LF, Ankrah L, Dosoo D, Adeniji E, Agyei O, Gyaase S, Amenga-Etego S, Gyan B, and Owusu-Agyei S. Epidemiology of soil transmitted Helminth infections in the middle-belt of Ghana, Africa. *Parasite Epidemiol.Control*. 2018; 3(3):e00071-
- Afewerk BA, Abera B, Seyoum W, Endale B, Kiber T, Goshu G, and Admass A. Soil-Transmitted Helminths and *Schistosoma mansoni* Infections in Ethiopian Orthodox Church Students around Lake Tana, Northwest Ethiopia. *PLoS.One*. 2016; 11(5):e0155915-
- Agbata EN, Morton RL, Bisoffi Z, Bottieau E, Greenaway C, Biggs BA, Montero N, Tran A, Rowbotham N, Arevalo-Rodriguez I, Myran DT, Noori T, Alonso-Coello P, Pottie K, and Requena-Mendez A. Effectiveness of Screening and Treatment Approaches for Schistosomiasis and Strongyloidiasis in Newly-Arrived Migrants from Endemic Countries in the EU/EEA: A Systematic Review. *Int.J.Environ.Res.Public Health*. 2018; 16(1):
- Ahmad AF, Hadip F, Ngui R, Lim YA, and Mahmud R. Serological and molecular detection of *Strongyloides stercoralis* infection among an Orang Asli community in Malaysia. *Parasitol.Res*. 2013; 112(8):2811-2816.
- Ahmadpour E, Ghanizadegan MA, Razavi A, Kangari M, Seyfi R, Shahdust M, Yazdanian A, Safarpour H, Bannazadeh BH, Zarean M, Hosseini SA, Norouzi R, Ebrahimi M, and Bangoura B. *Strongyloides stercoralis* infection in human immunodeficiency virus-infected patients and related risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Transbound.Emerg.Dis*. 2019; 66(6):2233-2243.
- Alcaraz CO, Adell RI, Sanchez PS, Blasco MJ, Sanchez OA, Aunon AS, and Calabuig DR. Characteristics and geographical profile of strongyloidiasis in healthcare area 11 of the Valencian community (Spain). *J.Infect*. 2004; 49(2):152-158.
- Alvaro MJ. Eosinophilic cholecystitis caused by *Ascaris lumbricoides*. *World J Gastroenterol*. 2008. 14(17):2783.
- Amoah ID, Singh G, Troell K, Reddy P, Stenstrom TA, and Bux F. Comparative assessment of DNA extraction procedures for *Ascaris* spp. eggs. *J.Helminthol*. 2019; 94(e78-
- Amor A, Rodriguez E, Saugar JM, Arroyo A, Lopez-Quintana B, Abera B, Yimer M, Yizengaw E, Zewdie D, Ayehubizu Z, Hailu T, Mulu W, Echazu A, Krolewieki AJ, Aparicio P, Herrador Z, Anegagrie M, and Benito A. High prevalence of *Strongyloides stercoralis* in school-aged children in a rural highland of north-western Ethiopia: the role of intensive diagnostic work-up. *Parasit.Vectors*. 2016; 9(1):617-

- Andersen LO, Roser D, Nejsum P, Nielsen HV, and Stensvold CR. Is supplementary bead beating for DNA extraction from nematode eggs by use of the NucliSENS easyMag protocol necessary? J.Clin.Microbiol. 2013; 51(4):1345-1347.
- Anderson NW, Klein DM, Dornink SM, Jespersen DJ, Kubofcik J, Nutman TB, Merrigan SD, Couturier MR, and Theel ES. Comparison of three immunoassays for detection of antibodies to *Strongyloides stercoralis*. Clin.Vaccine Immunol. 2014; 21(5):732-736.
- Anderson RC. Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission. Oxon: CAB International. 1992.
- Andreetta CM, de Paula FM, Meisel DMCL, Abdala E, Figueiredo CS, Camera PL, Yamashiro J, do Nascimento Goncalves EM, Castilho VLP, Chieffi PP, and Gryschek RCB. IgG reactivity with 40-35 kDa soluble and membrane antigen of *Strongyloides venezuelensis* in immunocompromised patients. Acta Trop. 2019; 190(357-360).
- Angheben A, Mistretta M, Gobbo M, Bonafini S, Iacovazzi T, Sepe A, Gobbi F, Marocco S, Rossanese A, and Bisoffi Z. Acute strongyloidiasis in Italian tourists returning from Southeast Asia. J.Travel.Med. 2011; 18(2):138-140.
- Anon. Review on the Epidemiological Profile of Helminthiasis and Their Control in the Western Pacific Region, 1997-2008. Western Pacific Regional Office of the World Health Organization, Manila. 2008.
- Anuradha R, Munisankar S, Dolla C, Kumaran P, Nutman TB, and Babu S. Parasite Antigen-Specific Regulation of Th1, Th2, and Th17 Responses in *Strongyloides stercoralis* Infection. J.Immunol. 2015; 195(5):2241-2250.
- Arakaki T, Iwanaga M, Kinjo F, Saito A, Asato R, and Ikeshiro T. Efficacy of agar-plate culture in detection of *Strongyloides stercoralis* infection. J.Parasitol. 1990; 76(3):425-428.
- Arifin N, Yunus MH, Nolan TJ, Lok JB, and Noordin R. Identification and Preliminary Evaluation of a Novel Recombinant Protein for Serodiagnosis of Strongyloidiasis. Am.J.Trop.Med.Hyg. 2018; 98(4):1165-1170.
- Ash, L. R. y Orihel, T. C. (2010). Atlas de parasitología humana, Editorial Médica Panamericana, Madrid.
- Aspöck H. *Trichuris thichiura* eggs in the Neolithic glacier mummy from the Alps, Parasitol Today. 1996.
- Assefa T, Woldemichael T, and Seyoum T. Evaluation of the modified Baermann's method in the laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis*. Ethiop.Med.J. 1991; 29(4):193-198.
- Asundi A, Beliavsky A, Liu XJ, Akaberi A, Schwarzer G, Bisoffi Z, Requena-Mendez A, Shrier I, and Greenaway C. Prevalence of strongyloidiasis and schistosomiasis among migrants: a systematic review and meta-analysis. Lancet Glob.Health. 2019; 7(2):e236-e248.
- Atkins NS, Lindo JF, Lee MG, Conway DJ, Bailey JW, Robinson RD, and Bundy DA. Humoral responses in human strongyloidiasis: correlations with infection chronicity. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 1997; 91(5):609-613.

- Augusto G, Nala R, Casmo V, Sabonete A, Mapaco L, and Monteiro J. Geographic distribution and prevalence of schistosomiasis and soil-transmitted helminths among schoolchildren in Mozambique. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2009; 81(5):799-803.
- Ayana M, Cools P, Mekonnen Z, Biruksew A, Dana D, Rashwan N, Prichard R, Vlamincck J, Verweij JJ, and Levecke B. Comparison of four DNA extraction and three preservation protocols for the molecular detection and quantification of soil-transmitted helminths in stool. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2019; 13(10):e0007778-
- Ayuntamiento de Barcelona, datos del 2018: Disponible en: <https://www.bcn.cat/estadistica/castella/dades/anuari/cap02/index.htm>
- Babamale OA, Ugbomoiko US, and Heukelbach J. High prevalence of *Plasmodium falciparum* and soil-transmitted helminth co-infections in a periurban community in Kwara State, Nigeria. *J.Infect.Public Health.* 2018; 11(1):48-53.
- Barda B, Albonico M, Ianniello D, Ame SM, Keiser J, Speich B, Rinaldi L, Cringoli G, Burioni R, Montresor A, and Utzinger J. How long can stool samples be fixed for an accurate diagnosis of soil-transmitted helminth infection using Mini-FLOTAC? *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2015; 9(4):e0003698-
- Barda BD, Rinaldi L, Ianniello D, Zepherine H, Salvo F, Sadutshang T, Cringoli G, Clementi M, and Albonico M. Mini-FLOTAC, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2013; 7(8):e2344-
- Barroso M, Salvador F, Sanchez-Montalva A, Bosch-Nicolau P, and Molina I. *Strongyloides stercoralis* infection: A systematic review of endemic cases in Spain. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2019; 13(3):e0007230-
- Basuni M, Muhi J, Othman N, Verweij JJ, Ahmad M, Miswan N, Rahumatullah A, Aziz FA, Zainudin NS, and Noordin R. A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2011; 84(2):338-343.
- Becker SL, Sieto B, Silue KD, Adjossan L, Kone S, Hatz C, Kern WV, N'goran EK, and Utzinger J. Diagnosis, clinical features, and self-reported morbidity of *Strongyloides stercoralis* and hookworm infection in a Co-endemic setting. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2011; 5(8):e1292-
- Beer RJ. Morphological descriptions of the egg and larval stages of *Trichuris suis* Schrank, 1788. *Parasitology.* 1973a; 67(3):263-278.
- Beer RJ. Studies on the biology of the life-cycle of *Trichuris suis* Schrank, 1788. *Parasitology.* 1973b; 67(3):253-262.
- Belhassen-Garcia M, Alonso-Sardon M, Martinez-Perez A, Soler C, Carranza-Rodriguez C, Perez-Arellano JL, Muro A, and Salvador F. Surveillance of strongyloidiasis in Spanish in-patients (1998-2014). *PLoS.One.* 2017a; 12(12):e0189449-
- Belhassen-Garcia M, Pardo-Lledias J, Perez D, V, Velasco-Tirado V, Siller RM, Cordero-Sanchez M, Vicente B, Hernandez ES, Munoz Bellido JL, and Muro A. Screening for parasite

- infections in immigrant children from low-income countries. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 2017b; 35(1):27-32.
- Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, and Hotez PJ. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet.* 2006; 367(9521):1521-1532.
- Bethony J, Chen J, Lin S, Xiao S, Zhan B, Li S, Xue H, Xing F, Humphries D, Yan W, Chen G, Foster V, Hawdon JM, and Hotez PJ. Emerging patterns of hookworm infection: influence of aging on the intensity of *Necator* infection in Hainan Province, People's Republic of China. *Clin.Infect.Dis.* 2002; 35(11):1336-1344.
- Bird C, Ame S, Albonico M, and Bickle Q. Do shoes reduce hookworm infection in school-aged children on Pemba Island, Zanzibar? A pragmatic trial. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 2014; 108(5):297-304.
- Bisoffi Z, Buonfrate D, Angheben A, Boscolo M, Anselmi M, Marocco S, Monteiro G, Gobbo M, Bisoffi G, and Gobbi F. Randomized clinical trial on ivermectin versus thiabendazole for the treatment of strongyloidiasis. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2011; 5(7):e1254-
- Bisoffi Z, Buonfrate D, Montresor A, Requena-Mendez A, Munoz J, Krolewiecki AJ, Gotuzzo E, Mena MA, Chiodini PL, Anselmi M, Moreira J, and Albonico M. *Strongyloides stercoralis*: a plea for action. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2013; 7(5):e2214-
- Bisoffi Z, Buonfrate D, Sequi M, Mejia R, Cimino RO, Krolewiecki AJ, Albonico M, Gobbo M, Bonafini S, Angheben A, Requena-Mendez A, Munoz J, and Nutman TB. Diagnostic accuracy of five serologic tests for *Strongyloides stercoralis* infection. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2014; 8(1):e2640-
- Bogitsh BJ, Carter CE, Oeltmann TN. *Human Parasitology*: Elsevier Academic Press. 2005. 459 p.
- Bon B, Houze S, Talabani H, Magne D, Belkadi G, Develoux M, Senghor Y, Chandenier J, Ancelle T, and Hennequin C. Evaluation of a rapid enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. *J.Clin.Microbiol.* 2010; 48(5):1716-1719.
- Boscolo M, Gobbo M, Mantovani W, Degani M, Anselmi M, Monteiro GB, Marocco S, Angheben A, Mistretta M, Santacatterina M, Tais S, and Bisoffi Z. Evaluation of an indirect immunofluorescence assay for strongyloidiasis as a tool for diagnosis and follow-up. *Clin.Vaccine Immunol.* 2007; 14(2):129-133.
- Bowie C, Purcell B, Shaba B, Makaula P, and Perez M. A national survey of the prevalence of schistosomiasis and soil transmitted helminths in Malawi. *BMC.Infect.Dis.* 2004; 4(49-
- Bradbury RS. *Ternidens deminutus* Revisited: A Review of Human Infections with the False Hookworm. *Trop.Med.Infect.Dis.* 2019; 4(3):
- Bradbury RS, Hii SF, Harrington H, Speare R, and Traub R. *Ancylostoma ceylanicum* Hookworm in the Solomon Islands. *Emerg.Infect.Dis.* 2017; 23(2):252-257.

- Brooker S, Whawell S, Kabatereine NB, Fenwick A, and Anderson RM. Evaluating the epidemiological impact of national control programmes for helminths. *Trends Parasitol.* 2004; 20(11):537-545.
- Bundy, D.A.P. and Cooper, E.S. *Trichuris* and trichuriasis in humans. *Advances in Parasitology.* 1989. 28, 108–174.
- Bungiro RD, Jr. and Cappello M. Detection of excretory/secretory coproantigens in experimental hookworm infection. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2005; 73(5):915-920.
- Buonfrate D, Gobbi F, Beltrame A, and Bisoffi Z. Severe Anemia and Lung Nodule in an Immunocompetent Adopted Girl with *Strongyloides stercoralis* Infection. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2016; 95(5):1051-1053.
- Buonfrate D, Mena MA, Angheben A, Requena-Mendez A, Munoz J, Gobbi F, Albonico M, Gotuzzo E, and Bisoffi Z. Prevalence of strongyloidiasis in Latin America: a systematic review of the literature. *Epidemiol.Infect.* 2015; 143(3):452-460.
- Buonfrate D, Salas-Coronas J, Munoz J, Maruri BT, Rodari P, Castelli F, Zammarchi L, Bianchi L, Gobbi F, Cabezas-Fernandez T, Requena-Mendez A, Godbole G, Silva R, Romero M, Chiodini PL, and Bisoffi Z. Multiple-dose versus single-dose ivermectin for *Strongyloides stercoralis* infection (Strong Treat 1 to 4): a multicentre, open-label, phase 3, randomised controlled superiority trial. *Lancet Infect.Dis.* 2019; 19(11):1181-1190.
- Burgueno MJ, Garcia-Bastos JL, and Gonzalez-Buitrago JM. [ROC curves in the evaluation of diagnostic tests]. *Med.Clin.(Barc.).* 1995; 104(17):661-670.
- Campbell SJ, Nery SV, Doi SA, Gray DJ, Soares Magalhaes RJ, McCarthy JS, Traub RJ, Andrews RM, and Clements AC. Complexities and Perplexities: A Critical Appraisal of the Evidence for Soil-Transmitted Helminth Infection-Related Morbidity. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2016; 10(5):e0004566-
- Campo PL, Gutierrez LA, and Cardona AJ. [Diagnosis of *Strongyloides Stercoralis* infection: meta-analysis on evaluation of conventional parasitological methods (1980-2013)]. *Rev.Esp.Salud Publica.* 2014; 88(5):581-600.
- Campo-Polanco LF, Sarmiento JMH, Mesa MA, Franco CJV, Lopez L, Botero LE, and Builes LAG. Strongyloidiasis in humans: diagnostic efficacy of four conventional methods and real-time polymerase chain reaction. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* 2018; 51(4):493-502.
- Chadeka EA, Nagi S, Sunahara T, Cheruiyot NB, Bahati F, Ozeki Y, Inoue M, Osada-Oka M, Okabe M, Hirayama Y, Changoma M, Adachi K, Mwende F, Kikuchi M, Nakamura R, Kalenda YDJ, Kaneko S, Hirayama K, Shimada M, Ichinose Y, Njenga SM, Matsumoto S, and Hamano S. Spatial distribution and risk factors of *Schistosoma haematobium* and hookworm infections among schoolchildren in Kwale, Kenya. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2017; 11(9):e0005872-
- Chatterjee BP, Santra A, Karmakar PR, and Mazumder DN. Evaluation of IgG4 response in ascariasis by ELISA for serodiagnosis. *Trop.Med.Int.Health.* 1996; 1(5):633-639.

- Cheesbrough M. Direct Laboratory Practice in Tropical Countries (Part-1) New York: Cambridge University Press; 2009. pp. 29–35.
- Chidambaram M, Parija SC, Toi PC, Mandal J, Sankaramoorthy D, George S, Natarajan M, and Padukone S. Evaluation of the utility of conventional polymerase chain reaction for detection and species differentiation in human hookworm infections. *Trop.Parasitol.* 2017; 7(2):111-116.
- Chhakda T, Muth S, Socheat D, and Odermatt P. Intestinal parasites in school-aged children in villages bordering Tonle Sap Lake, Cambodia. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health.* 2006; 37(5):859-864.
- Cobo F, Salas-Coronas J, Cabezas-Fernandez MT, Vazquez-Villegas J, Cabeza-Barrera MI, and Soriano-Perez MJ. Infectious Diseases in Immigrant Population Related to the Time of Residence in Spain. *J.Immigr.Minor.Health.* 2016; 18(1):8-15.
- Conway DJ, Bailey JW, Lindo JF, Robinson RD, Bundy DA, and Bianco AE. Serum IgG reactivity with 41-, 31-, and 28-kDa larval proteins of *Strongyloides stercoralis* in individuals with strongyloidiasis. *J.Infect.Dis.* 1993; 168(3):784-787.
- Conway DJ, Lindo JF, Robinson RD, Bundy DA, and Bianco AE. *Strongyloides stercoralis*: characterization of immunodiagnostic larval antigens. *Exp.Parasitol.* 1994; 79(2):99-105.
- Coombs, Isabel & Crompton, D. W. T. (David William Thomasson), 1937- (1991). A guide to human helminths. Taylor and Francis, London ; New York
- Cooper ES, Duff EM, Howell S, and Bundy DA. 'Catch-up' growth velocities after treatment for Trichuris dysentery syndrome. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 1995; 89(6):653-
- Copelovitch L, Sam OO, Taraquinio S, and Chanpheaktra N. Childhood nephrotic syndrome in Cambodia: an association with gastrointestinal parasites. *J.Pediatr.* 2010; 156(1):76-81.
- Corral MA, Paula FM, Meisel DM, Castilho VL, Goncalves EM, Levy D, Bydlowski SP, Chieffi PP, Castro-Borges W, and Gryscek RC. Potential immunological markers for diagnosis of human strongyloidiasis using heterologous antigens. *Parasitology.* 2017; 144(2):124-130.
- Corripio IF, Cisneros MJ, and Ormaechea TG. [Diagnostic of intestinal parasitosis by coproantigen detection]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 2010; 28 Suppl 1(33-39.
- Cox FEG. The Wellcome Trust Illustrated History of Tropical Diseases. Ed. Empress Litho, London 1996.
- Cremades Romero MJ, Igual AR, Ricart OC, Estelles PF, Pastor-Guzman A, and Menendez VR. [Infection by *Strongyloides stercoralis* in the county of Safor, Spain]. *Med.Clin.(Barc.).* 1997; 109(6):212-215.
- Cringoli G. FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. *Parassitologia.* 2006; 48(3):381-384.

- Crowe AL, Smith P, Ward L, Currie BJ, and Baird R. Decreasing prevalence of *Trichuris trichiura* (whipworm) in the Northern Territory from 2002 to 2012. *Med.J.Aust.* 2014; 200(5):286-289.
- Cuenca-Gomez JA, Salas-Coronas J, Cabezas-Fernandez MT, Vazquez-Villegas J, Soriano-Perez MJ, and Cobo F. [Imported hookworm infection in Almeria]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 2013; 31(9):599-601.
- Cunningham LJ, Stothard JR, Osei-Atweneboana M, Armoo S, Verweij JJ, and Adams ER. Developing a real-time PCR assay based on multiplex high-resolution melt-curve analysis: a pilot study in detection and discrimination of soil-transmitted helminth and schistosome species. *Parasitology.* 2018; 145(13):1733-1738.
- Dacal E, Saugar JM, de LA, Hernandez-de-Mingo M, Robinson E, Koster PC, Aznar-Ruiz-de-Alegria ML, Espasa M, Ninda A, Gandasegui J, Sulleiro E, Moreno M, Salvador F, Molina I, Rodriguez E, and Carmena D. Prevalence and molecular characterization of *Strongyloides stercoralis*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., and *Blastocystis* spp. isolates in school children in Cubal, Western Angola. *Parasit.Vectors.* 2018; 11(1):67-
- Davies J, Majumdar SS, Forbes RT, Smith P, Currie BJ, and Baird RW. Hookworm in the Northern Territory: down but not out. *Med.J.Aust.* 2013; 198(5):278-281.
- de Alegria MLAR, Colmenares K, Espasa M, Amor A, Lopez I, Nindia A, Kanjala J, Guilherme D, Sulleiro E, Barriga B, Gil E, Salvador F, Bocanegra C, Lopez T, Moreno M, and Molina I. Prevalence of *Strongyloides stercoralis* and Other Intestinal Parasite Infections in School Children in a Rural Area of Angola: A Cross-Sectional Study. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2017; 97(4):1226-1231.
- de Kaminsky RG. Evaluation of three methods for laboratory diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *J.Parasitol.* 1993; 79(2):277-280.
- De Vlas SJ, Stolk WA, le Rutte EA, Hontelez JA, Bakker R, Blok DJ, Cai R, Houweling TA, Kulik MC, Lenk EJ, Luyendijk M, Matthijsse SM, Redekop WK, Wagenaar I, Jacobson J, Nagelkerke NJ, and Richardus JH. Concerted Efforts to Control or Eliminate Neglected Tropical Diseases: How Much Health Will Be Gained? *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2016; 10(2):e0004386-
- DeWorm3 (<http://www.nhm.ac.uk/our-science/our-work/sustainability/deworm3.html>)
- Demeler J, Ramunke S, Wolken S, Ianiello D, Rinaldi L, Gahutu JB, Cringoli G, von Samson-Himmelstjerna G, and Krucken J. Discrimination of gastrointestinal nematode eggs from crude fecal egg preparations by inhibitor-resistant conventional and real-time PCR. *PLoS.One.* 2013; 8(4):e61285-
- Deng MH, Zhong LY, Kamolnetr O, Limpanont Y, and Lv ZY. Detection of helminths by loop-mediated isothermal amplification assay: a review of updated technology and future outlook. *Infect.Dis.Poverty.* 2019; 8(1):20-
- Desowitz RS. Review of research in parasitology in Singapore. *Singapore Med.J.* 1963; 3(30-33).

- Dreyer G, Fernandes-Silva E, Alves S, Rocha A, Albuquerque R, and Addiss D. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. J.Clin.Microbiol. 1996; 34(10):2569-2571.
- Easton AV, Oliveira RG, O'Connell EM, Kepha S, Mwandawiro CS, Njenga SM, Kihara JH, Mwatele C, Odieri MR, Brooker SJ, Webster JP, Anderson RM, and Nutman TB. Multi-parallel qPCR provides increased sensitivity and diagnostic breadth for gastrointestinal parasites of humans: field-based inferences on the impact of mass deworming. Parasit.Vectors. 2016; 9(38-
- Easton AV, Oliveira RG, Walker M, O'Connell EM, Njenga SM, Mwandawiro CS, Webster JP, Nutman TB, and Anderson RM. Sources of variability in the measurement of *Ascaris lumbricoides* infection intensity by Kato-Katz and qPCR. Parasit.Vectors. 2017; 10(1):256-
- END7 (<https://www.sabin.org/programs/global-network/end7-campaign>)
- Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill III, F.R., & Smith, T.F. Real-Time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. Clinical Microbiology Reviews. 2006. 19(1), 165-256.
- Esteban R, V, Franco SJ, and Briones Urtiaga ML. Pulmonary *Strongyloides stercoralis* infection. Arch.Bronconeumol. 2016; 52(8):442-443.
- Farmer HF, Jr. Hookworm eradication program of Florida in the early 20th century. J.Fla.Med.Assoc. 1986; 73(4):300-304.
- Fernandez-Soto P, Sanchez-Hernandez A, Gandasegui J, Bajo SC, Lopez-Aban J, Saugar JM, Rodriguez E, Vicente B, and Muro A. Strong-LAMP: A LAMP Assay for *Strongyloides* spp. Detection in Stool and Urine Samples. Towards the Diagnosis of Human Strongyloidiasis Starting from a Rodent Model. PLoS.Negl.Trop.Dis. 2016; 10(7):e0004836-
- Ferris H. 2008. The "Nematode-Plant Expert Information System", A Virtual Encyclopedia on Soil and Plant Nematodes. Comparison of Morphology- and DNA-based Classifications. California: Department of Nematology, University of California.
- Fischer P, Bonow I, Supali T, Ruckert P, and Rahmah N. Detection of filaria-specific IgG4 antibodies and filarial DNA, for the screening of blood spots for *Brugia timori*. Ann.Trop.Med.Parasitol. 2005; 99(1):53-60.
- Formenti F, La MG, Perandin F, Pajola B, Romano M, Santucci B, Silva R, Giorli G, Bisoffi Z, and Buonfrate D. A diagnostic study comparing conventional and real-time PCR for *Strongyloides stercoralis* on urine and on faecal samples. Acta Trop. 2019; 190(284-287.
- Fradejas I, Herrero-Martinez JM, Lizasoain M, Rodriguez de Las PE, and Perez-Ayala A. Comparative study of two commercial tests for *Strongyloides stercoralis* serologic diagnosis. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg. 2018; 112(12):561-567.
- G-FINDER (http://polycyuresresearch.org/downloads/Y10_G-FINDER_full_report.pdf)

- Galiano A, Trelis M, Moya-Herraiz A, Sanchez-Plumed J, and Merino JF. Donor-derived *Strongyloides stercoralis* hyperinfection syndrome after simultaneous kidney/pancreas transplantation. *Int.J.Infect.Dis.* 2016; 51(19-21).
- Galzerano A, Sabatini E, and Duri D. *Ascaris lumbricoides* infection: an unexpected cause of pancreatitis in a western Mediterranean country. *East Mediterr.Health J.* 2010; 16(3):350-351.
- Garcia-Parra CJ, Cano-Ballesteros JC, Ortega-Sanchez E, and Martin-Rabadan P. [A 19 year old Brazilian male with severe iron deficiency anemia]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin.* 2015; 33(3):211-212.
- Garg PK, Perry S, Dorn M, Hardcastle L, and Parsonnet J. Risk of intestinal helminth and protozoan infection in a refugee population. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2005; 73(2):386-391.
- Gasparinho C, Mirante MC, Centeno-Lima S, Istrate C, Mayer AC, Tavira L, Nery SV, and Brito M. Etiology of Diarrhea in Children Younger Than 5 Years Attending the Bengo General Hospital in Angola. *Pediatr.Infect.Dis.J.* 2016; 35(2):e28-e34.
- George S, Levecke B, Kattula D, Velusamy V, Roy S, Geldhof P, Sarkar R, and Kang G. Molecular Identification of Hookworm Isolates in Humans, Dogs and Soil in a Tribal Area in Tamil Nadu, India. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2016; 10(8):e0004891-
- Gomez-Junyent J, Paredes D, Hurtado JC, Requena-Mendez A, Ruiz A, Valls ME, Vila J, and Munoz J. High seroprevalence of *Strongyloides stercoralis* among individuals from endemic areas considered for solid organ transplant donation: A retrospective serum-bank based study. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2018; 12(11):e0007010-
- Gonzaga HT, Ribeiro VS, Cunha-Junior JP, Ueta MT, and Costa-Cruz JM. Usefulness of concanavalin-A non-binding fraction of *Strongyloides venezuelensis* larvae to detect IgG and IgA in human strongyloidiasis. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* 2011; 70(1):78-84.
- Gonzalez A, Gallo M, Valls ME, Munoz J, Puyol L, Pinazo MJ, Mas J, and Gascon J. Clinical and epidemiological features of 33 imported *Strongyloides stercoralis* infections. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 2010; 104(9):613-616.
- Gordon CA, McManus DP, Acosta LP, Olveda RM, Williams GM, Ross AG, Gray DJ, and Gobert GN. Multiplex real-time PCR monitoring of intestinal helminths in humans reveals widespread polyparasitism in Northern Samar, the Philippines. *Int.J.Parasitol.* 2015; 45(7):477-483.
- Gorgani-Firouzjaee T, Kalantari N, Javanian M, and Ghaffari S. *Strongyloides stercoralis*: detection of parasite-derived DNA in serum samples obtained from immunosuppressed patients. *Parasitol.Res.* 2018; 117(9):2927-2932.
- Grove DI. Human strongyloidiasis. *Adv.Parasitol.* 1996; 38(251-309).
- Grover SB, Pati NK, and Rattan SK. Sonographic diagnosis of *Ascaris*-induced cholecystitis and pancreatitis in a child. *J.Clin.Ultrasound.* 2001; 29(4):254-259.
- Guyatt H. Do intestinal nematodes affect productivity in adulthood? *Parasitol.Today.* 2000; 16(4):153-158.

H2020 (<https://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/>)

- Hailu T, Alemu M, Abera B, Mulu W, Yizengaw E, Genanew A, and Bereded F. Multivariate analysis of factors associated with *Schistosoma mansoni* and hookworm infection among primary school children in rural Bahir Dar, Northwest Ethiopia. *Trop.Dis.Travel.Med.Vaccines*. 2018; 4(4-
- Hall A, Hewitt G, Tuffrey V, and de SN. A review and meta-analysis of the impact of intestinal worms on child growth and nutrition. *Matern.Child Nutr*. 2008; 4 Suppl 1(118-236.
- Halwindi H, Magnussen P, Olsen A, and Lisulo M. POTENTIAL CONTRIBUTION OF ADULT POPULATIONS TO THE MAINTENANCE OF SCHISTOSOMIASIS AND SOIL-TRANSMITTED HELMINTH INFECTIONS IN THE SIAVONGA AND MAZABUKA DISTRICTS OF ZAMBIA. *J.Biosoc.Sci*. 2017; 49(2):265-275.
- Haswell-Elkins MR, Elkins DB, and Anderson RM. Evidence for predisposition in humans to infection with *Ascaris*, hookworm, *Enterobius* and *Trichuris* in a South Indian fishing community. *Parasitology*. 1987; 95 (Pt 2)(323-337.
- Henriquez-Camacho C, Gotuzzo E, Echevarria J, White AC, Jr., Terashima A, Samalvides F, Perez-Molina JA, and Plana MN. Ivermectin versus albendazole or thiabendazole for *Strongyloides stercoralis* infection. *Cochrane.Database.Syst.Rev*. 2016; 1):CD007745-
- Hii SF, Senevirathna D, Llewellyn S, Inpankaew T, Odermatt P, Khieu V, Muth S, McCarthy J, and Traub RJ. Development and Evaluation of a Multiplex Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for Hookworm Species in Human Stool. *Am.J.Trop.Med.Hyg*. 2018; 99(5):1186-1193.
- Hotez PJ, Bethony JM, Oliveira SC, Brindley PJ, and Loukas A. Multivalent anthelmintic vaccine to prevent hookworm and schistosomiasis. *Expert.Rev.Vaccines*. 2008; 7(6):745-752.
- Hotez PJ and Gurwith M. Europe's neglected infections of poverty. *Int.J.Infect.Dis*. 2011; 15(9):e611-e619.
- Ibikounle M, Onzo-Aboki A, Doritchamou J, Tougoue JJ, Boko PM, Savassi BS, Siko EJ, Dare A, Batcho W, Massougbdji A, Kinde-Gazard DA, and Kabore A. Results of the first mapping of soil-transmitted helminths in Benin: Evidence of countrywide hookworm predominance. *PLoS.Negl.Trop.Dis*. 2018; 12(3):e0006241-
- Iborra MA, Carrilero B, and Segovia M. [Ancylostomiasis: a potential cause of iron deficiency anemia in patients from endemic areas]. *Enferm.Infecc.Microbiol.Clin*. 2009; 27(7):427-
- Ines EJ, Souza JN, Santos RC, Souza ES, Santos FL, Silva ML, Silva MP, Teixeira MC, and Soares NM. Efficacy of parasitological methods for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* and hookworm in faecal specimens. *Acta Trop*. 2011; 120(3):206-210.
- Inocencio da LR, Linsuke S, Lutumba P, Hasker E, and Boelaert M. Assessment of schistosomiasis and soil-transmitted helminths prevalence in school-aged children and opportunities for integration of control in local health services in Kwilu Province, the Democratic Republic of the Congo. *Trop.Med.Int.Health*. 2017; 22(11):1442-1450.

- Janwan P, Intapan PM, Thanchomnang T, Lulitanond V, Anamnart W, and Maleewong W. Rapid detection of *Opisthorchis viverrini* and *Strongyloides stercoralis* in human fecal samples using a duplex real-time PCR and melting curve analysis. *Parasitol.Res.* 2011; 109(6):1593-1601.
- Jarret EE, Miller HRP. Productions and activities of IgE in helminth infection. *Prog Allergy.* 1982;31:178–233.
- Javanian M, Gorgani-Firouzjaee T, and Kalantrai N. Comparison of ELISA and PCR of the 18S rRNA gene for detection of human strongyloidiasis using serum sample. *Infect.Dis.(Lond).* 2019; 51(5):360-367.
- Jex AR, Lim YA, Bethony JM, Hotez PJ, Young ND, and Gasser RB. Soil-transmitted helminths of humans in Southeast Asia--towards integrated control. *Adv.Parasitol.* 2011; 74(231-265).
- Johnston FH, Morris PS, Speare R, McCarthy J, Currie B, Ewald D, Page W, and Dempsey K. Strongyloidiasis: a review of the evidence for Australian practitioners. *Aust.J.Rural.Health.* 2005; 13(4):247-254.
- Jones HI. Intestinal parasite infections in Western Australian Aborigines. *Med.J.Aust.* 1980; 2(7):375-380.
- Jonker FA, Calis JC, Phiri K, Brien EA, Khoffi H, Brabin BJ, Verweij JJ, van Hensbroek MB, and van LL. Real-time PCR demonstrates *Ancylostoma duodenale* is a key factor in the etiology of severe anemia and iron deficiency in Malawian pre-school children. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2012; 6(3):e1555-
- Jourdan PM, Lamberton PHL, Fenwick A, and Addiss DG. Soil-transmitted helminth infections. *Lancet.* 2018; 391(10117):252-265.
- Kaisar MMM, Brien EA, Djuardi Y, Sartono E, Yazdanbakhsh M, Verweij JJ, Supali T, and VAN LL. Improved diagnosis of *Trichuris trichiura* by using a bead-beating procedure on ethanol preserved stool samples prior to DNA isolation and the performance of multiplex real-time PCR for intestinal parasites. *Parasitology.* 2017; 144(7):965-974.
- Karshima SN. Prevalence and distribution of soil-transmitted helminth infections in Nigerian children: a systematic review and meta-analysis. *Infect.Dis.Poverty.* 2018; 7(1):69-
- Kaya F, Inkaya AC, Ertenli AI, Abbasoglu O, Aksoy S, Akyon YY, and Erguven S. The investigation of *Strongyloides stercoralis* seroprevalence in immunosuppressed patients in Turkey. *Turk.J.Med.Sci.* 2019; 49(1):16-19.
- Keiser J, N'goran EK, Traore M, Lohourignon KL, Singer BH, Lengeler C, Tanner M, and Utzinger J. Polyparasitism with *Schistosoma mansoni*, geohelminths, and intestinal protozoa in rural Cote d'Ivoire. *J.Parasitol.* 2002; 88(3):461-466.
- Ketzis JK and Conan A. Estimating occurrence of *Strongyloides stercoralis* in the Caribbean island countries: Implications for monitoring and control. *Acta Trop.* 2017; 171(90-95).
- Kino S. Experimental infections on the human body with ascarides. *Japan Med World* 1922; 15:317-20).

- Knopp S, Rinaldi L, Khamis IS, Stothard JR, Rollinson D, Maurelli MP, Steinmann P, Marti H, Cringoli G, and Utzinger J. A single FLOTAC is more sensitive than triplicate Kato-Katz for the diagnosis of low-intensity soil-transmitted helminth infections. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 2009; 103(4):347-354.
- Knopp S, Salim N, Schindler T, Karagiannis Voules DA, Rothen J, Lweno O, Mohammed AS, Singo R, Benninghoff M, Nsojo AA, Genton B, and Daubenberger C. Diagnostic accuracy of Kato-Katz, FLOTAC, Baermann, and PCR methods for the detection of light-intensity hookworm and *Strongyloides stercoralis* infections in Tanzania. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2014; 90(3):535-545.
- Koosha S, Fesharaki M, and Rokni MB. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis of human strongyloidiasis. *Indian J.Gastroenterol.* 2004; 23(6):214-216.
- Krasnonos, L. N. (1978). Prolonged survival of *Ascaris lumbricoides* L., 1758 ova in the soil in Samarkand. *Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni* 47, 103–105
- Krolewiecki AJ, Lammie P, Jacobson J, Gabrielli AF, Levecke B, Socias E, Arias LM, Sosa N, Abraham D, Cimino R, Echazu A, Crudo F, Vercruysse J, and Albonico M. A public health response against *Strongyloides stercoralis*: time to look at soil-transmitted helminthiasis in full. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2013; 7(5):e2165-
- Krolewiecki AJ, Ramanathan R, Fink V, McAuliffe I, Cajal SP, Won K, Juarez M, Di PA, Tapia L, Acosta N, Lee R, Lammie P, Abraham D, and Nutman TB. Improved diagnosis of *Strongyloides stercoralis* using recombinant antigen-based serologies in a community-wide study in northern Argentina. *Clin.Vaccine Immunol.* 2010; 17(10):1624-1630.
- Kumwenda S, Msefula C, Kadewa W, Diness Y, Kato C, Morse T, and Ngwira B. Is there a difference in prevalence of helminths between households using ecological sanitation and those using traditional pit latrines? A latrine based cross sectional comparative study in Malawi. *BMC.Res.Notes.* 2017; 10(1):200-
- Landis J.R., Koch G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977; 33:159-174
- Lassen B, Janson M, Viltrop A, Neare K, Hutt P, Golovljova I, Tummeleht L, and Jokelainen P. Serological Evidence of Exposure to Globally Relevant Zoonotic Parasites in the Estonian Population. *PLoS.One.* 2016; 11(10):e0164142-
- Lemos M, Fancony C, Moura S, Mirante C, Sousa P, Barros H, Nery S, and Brito M. Integrated community-based intervention for urinary schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in children from Caxito, Angola. *Int.Health.* 2019;
- Lepper HC, Prada JM, Davis EL, Gunawardena SA, and Hollingsworth TD. Complex interactions in soil-transmitted helminth co-infections from a cross-sectional study in Sri Lanka. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 2018; 112(8):397-404.
- Leroux LP, Nasr M, Valanparambil R, Tam M, Rosa BA, Siciliani E, Hill DE, Zarlenga DS, Jaramillo M, Weinstock JV, Geary TG, Stevenson MM, Urban JF, Jr., Mitreva M, and Jardim A. Analysis of the *Trichuris suis* excretory/secretory proteins as a function of life cycle stage and their immunomodulatory properties. *Sci.Rep.* 2018; 8(1):15921-

- Leta GT, French M, Dorny P, Vercruysse J, and Levecke B. Comparison of individual and pooled diagnostic examination strategies during the national mapping of soil-transmitted helminths and *Schistosoma mansoni* in Ethiopia. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2018; 12(9):e0006723-
- Levecke B, Behnke JM, Ajampur SS, Albonico M, Ame SM, Charlier J, Geiger SM, Hoa NT, Kamwa Ngassam RI, Kotze AC, McCarthy JS, Montresor A, Periago MV, Roy S, Tchuem Tchuente LA, Thach DT, and Vercruysse J. A comparison of the sensitivity and fecal egg counts of the McMaster egg counting and Kato-Katz thick smear methods for soil-transmitted helminths. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2011; 5(6):e1201-
- Lillywhite JE, Cooper ES, Needham CS, Venugopal S, Bundy DA, and Bianco AE. Identification and characterization of excreted/secreted products of *Trichuris trichiura*. *Parasite Immunol.* 1995; 17(1):47-54.
- Lim MD, Brooker SJ, Belizario VY, Jr., Gay-Andrieu F, Gilleard J, Levecke B, van LL, Medley GF, Mekonnen Z, Mirams G, Njenga SM, Odiere MR, Rudge JW, Stuyver L, Vercruysse J, Vlamincck J, and Walson JL. Diagnostic tools for soil-transmitted helminths control and elimination programs: A pathway for diagnostic product development. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2018; 12(3):e0006213-
- Liu J, Gratz J, Amour C, Kibiki G, Becker S, Janaki L, Verweij JJ, Taniuchi M, Sobuz SU, Haque R, Haverstick DM, and Houtp ER. A laboratory-developed TaqMan Array Card for simultaneous detection of 19 enteropathogens. *J.Clin.Microbiol.* 2013; 51(2):472-480.
- Llewellyn S, Inpankaew T, Nery SV, Gray DJ, Verweij JJ, Clements AC, Gomes SJ, Traub R, and McCarthy JS. Application of a Multiplex Quantitative PCR to Assess Prevalence and Intensity Of Intestinal Parasite Infections in a Controlled Clinical Trial. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2016; 10(1):e0004380-
- Lo NC, Lai YS, Karagiannis-Voules DA, Bogoch II, Coulibaly JT, Bendavid E, Utzinger J, Vounatsou P, and Andrews JR. Assessment of global guidelines for preventive chemotherapy against schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: a cost-effectiveness modelling study. *Lancet Infect.Dis.* 2016; 16(9):1065-1075.
- Lodh N, Caro R, Sofer S, Scott A, Krolewiecki A, and Shiff C. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis*: Detection of parasite-derived DNA in urine. *Acta Trop.* 2016; 163(9-13).
- Longfils P, Heang UK, Soeng H, and Sinuon M. Weekly iron and folic acid supplementation as a tool to reduce anemia among primary school children in Cambodia. *Nutr.Rev.* 2005; 63(12 Pt 2):S139-S145.
- Lutfalla G and Uze G. Performing quantitative reverse-transcribed polymerase chain reaction experiments. *Methods Enzymol.* 2006; 410(386-400).
- Machado ER, Faccioli LH, Costa-Cruz JM, Lourenco EV, Roque-Barreira MC, Goncalves-Pires MR, and Ueta MT. *Strongyloides venezuelensis*: the antigenic identity of eight strains for the immunodiagnosis of human strongyloidiasis. *Exp.Parasitol.* 2008; 119(1):7-14.
- Magnaval JF, Mansuy JM, Villeneuve L, and Cassaing S. A retrospective study of autochthonous strongyloidiasis in Region Midi-Pyrenees (Southwestern France). *Eur.J.Epidemiol.* 2000; 16(2):179-182.

- Maizels RM, Baxter ML, Robertson BD and Selkirk ME. Parasite antigens, parasite genes: A laboratory manual for molecular parasitology. Cambridge University Press: New York. (1992). 224 pp.
- Mandomando IM, Macete EV, Ruiz J, Sanz S, Abacassamo F, Valles X, Sacarlal J, Navia MM, Vila J, Alonso PL, and Gascon J. Etiology of diarrhea in children younger than 5 years of age admitted in a rural hospital of southern Mozambique. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2007; 76(3):522-527.
- Manganelli L, Berrilli F, Di CD, Ercoli L, Capelli G, Otranto D, and Giangaspero A. Intestinal parasite infections in immigrant children in the city of Rome, related risk factors and possible impact on nutritional status. *Parasit.Vectors.* 2012; 5(265-
- Manz KM, Clowes P, Kroidl I, Kowuor DO, Geldmacher C, Ntinginya NE, Maboko L, Hoelscher M, and Saathoff E. *Trichuris trichiura* infection and its relation to environmental factors in Mbeya region, Tanzania: A cross-sectional, population-based study. *PLoS.One.* 2017; 12(4):e0175137-
- Martin Sanchez AM, Hernandez GA, Gonzalez FM, Afonso RO, Hernandez CM, and Perez Arellano JL. [Intestinal parasitosis in the asymptomatic Subsaharian immigrant population. Gran Canaria 2000]. *Rev.Clin.Esp.* 2004; 204(1):14-17.
- Martinez-Perez A and Lopez-Velez R. Is strongyloidiasis endemic in Spain? *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2015; 9(2):e0003482-
- Martinez-Perez A, Roure DS, Belhassen-Garcia M, Torrus-Tendero D, Perez-Arellano JL, Cabezas T, Soler C, Diaz-Menendez M, Navarro M, Trevino B, and Salvador F. Management of severe strongyloidiasis attended at reference centers in Spain. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2018; 12(2):e0006272-
- McSharry C, Xia Y, Holland CV, and Kennedy MW. Natural immunity to *Ascaris lumbricoides* associated with immunoglobulin E antibody to ABA-1 allergen and inflammation indicators in children. *Infect.Immun.* 1999; 67(2):484-489.
- Means AR, Jacobson J, Mosher AW, and Walson JL. Integrated Healthcare Delivery: A Qualitative Research Approach to Identifying and Harmonizing Perspectives of Integrated Neglected Tropical Disease Programs. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2016; 10(10):e0005085-
- Mejia R, Vicuna Y, Broncano N, Sandoval C, Vaca M, Chico M, Cooper PJ, and Nutman TB. A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2013; 88(6):1041-1047.
- Meurs L, Polderman AM, Vinkeles Melchers NV, Brienens EA, Verweij JJ, Groosjohan B, Mendes F, Mechendura M, Hepp DH, Langenberg MC, Edelenbosch R, Polman K, and van LL. Diagnosing Polyparasitism in a High-Prevalence Setting in Beira, Mozambique: Detection of Intestinal Parasites in Fecal Samples by Microscopy and Real-Time PCR. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2017; 11(1):e0005310-
- Midzi N, Mduluzi T, Chimbari MJ, Tshuma C, Charimari L, Mhlanga G, Manangazira P, Munyati SM, Phiri I, Mutambu SL, Midzi SS, Ncube A, Muranzi LP, Rusakaniko S, and Mutapi F. Distribution of schistosomiasis and soil transmitted helminthiasis in

- Zimbabwe: towards a national plan of action for control and elimination. PLoS.Negl.Trop.Dis. 2014; 8(8):e3014-
- Ministerio de Asuntos Exteriores. Etiopía.Ficha del país. 2019.
- Moghaddassani H, Mirhendi H, Hosseini M, Rokni M, Mowlavi G, and Kia E. Molecular Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* Infection by PCR Detection of Specific DNA in Human Stool Samples. Iran J.Parasitol. 2011; 6(2):23-30.
- Molla E and Mamo H. Soil-transmitted helminth infections, anemia and undernutrition among schoolchildren in Yirgacheffee, South Ethiopia. BMC.Res.Notes. 2018; 11(1):585-
- Monge-Maillo B, Lopez-Velez R, Norman FF, Ferrere-Gonzalez F, Martinez-Perez A, and Perez-Molina JA. Screening of imported infectious diseases among asymptomatic sub-Saharan African and Latin American immigrants: a public health challenge. Am.J.Trop.Med.Hyg. 2015; 92(4):848-856.
- Monge-Maillo B, Navarro M, Rodriguez E, Ramos Rincon JM, Chamorro TS, Jimenez SS, Casas Del Corral MJ, and Lopez-Velez R. Community screening campaign for *Strongyloides stercoralis* among Latin American immigrants in Spain. Clin.Microbiol.Infect. 2018; 24(11):1220-1221.
- Montes M, Sawhney C, and Barros N. *Strongyloides stercoralis*: there but not seen. Curr.Opin.Infect.Dis. 2010; 23(5):500-504.
- Mugambi RM, Agola EL, Mwangi IN, Kinyua J, Shiraho EA, and Mkoji GM. Development and evaluation of a Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique for the detection of hookworm (*Necator americanus*) infection in fecal samples. Parasit.Vectors. 2015; 8(574)-
- Muller R. Worms and human disease. 2nd Edition, Oxon: CABI Publishing. 2002.
- Muller I, Yap P, Steinmann P, Damons BP, Schindler C, Seelig H, Htun NS, Probst-Hensch N, Gerber M, du RR, Puhse U, Walter C, and Utzinger J. Intestinal parasites, growth and physical fitness of schoolchildren in poor neighbourhoods of Port Elizabeth, South Africa: a cross-sectional survey. Parasit.Vectors. 2016; 9(1):488-
- Mwale K and Siziya S. Intestinal Infestations in Under-Five Children in Zambia. Int.J.MCH.AIDS. 2015; 4(2):40-46.
- Ngui R, Lim YA, and Chua KH. Rapid detection and identification of human hookworm infections through high resolution melting (HRM) analysis. PLoS.One. 2012; 7(7):e41996-
- Nikolay B, Brooker SJ, and Pullan RL. Sensitivity of diagnostic tests for human soil-transmitted helminth infections: a meta-analysis in the absence of a true gold standard. Int.J.Parasitol. 2014; 44(11):765-774.
- Nitin S, Venkatesh V, Husain N, Masood J, and Agarwal GG. Overview of intestinal parasitic prevalence in rural and urban population in Lucknow, north India. J.Communit.Dis. 2007; 39(4):217-223.

- Njaanake KH, Vennervald BJ, Simonsen PE, Madsen H, Mukoko DA, Kimani G, Jaoko WG, and Estambale BB. *Schistosoma haematobium* and soil-transmitted Helminths in Tana Delta District of Kenya: infection and morbidity patterns in primary schoolchildren from two isolated villages. BMC.Infect.Dis. 2016; 16(57-
- Njuguna J. Effect of eliminating open defecation on diarrhoeal morbidity: an ecological study of Nyando and Nambale sub-counties, Kenya. BMC.Public Health. 2016; 15(712-
- Noble, E. R. 1., & Noble, G. A. (1976). Parasitology: the biology of animal parasites. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Noble, E. R. 1., & Noble, G. A. (1982). Parasitology: the biology of animal parasites. 5th ed. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Norsyahida A, Riazi M, Sadjjadi SM, Muhammad HY, Low HC, Zeehaida M, and Noordin R. Laboratory detection of strongyloidiasis: IgG-, IgG4 - and IgE-ELISAs and cross-reactivity with lymphatic filariasis. Parasite Immunol. 2013; 35(5-6):174-179.
- Nute AW, Endeshaw T, Stewart AEP, Sata E, Bayissasse B, Zerihun M, Gessesse D, Chernet A, Chanyalew M, Tedesse Z, King JD, Emerson PM, Callahan EK, and Nash SD. Prevalence of soil-transmitted helminths and *Schistosoma mansoni* among a population-based sample of school-age children in Amhara region, Ethiopia. Parasit.Vectors. 2018; 11(1):431-
- Ojja S, Kisaka S, Ediau M, Tuhebwe D, Kisakye AN, Halage AA, Mugambe RK, and Mutyoba JN. Prevalence, intensity and factors associated with soil-transmitted helminths infections among preschool-age children in Hoima district, rural western Uganda. BMC.Infect.Dis. 2018; 18(1):408-
- Oliveira D, Ferreira FS, Atouguia J, Fortes F, Guerra A, and Centeno-Lima S. Infection by Intestinal Parasites, Stunting and Anemia in School-Aged Children from Southern Angola. PLoS.One. 2015; 10(9):e0137327-
- Page W and Speare R. Chronic strongyloidiasis - Don't look and you won't find. Aust.Fam.Physician. 2016; 45(1):40-44.
- Paige SB, Friant S, Clech L, Malave C, Kemigabo C, Obeti R, and Goldberg TL. Combining Footwear with Public Health Iconography to Prevent Soil-Transmitted Helminth Infections. Am.J.Trop.Med.Hyg. 2017; 96(1):205-213.
- Periago MV, Garcia R, Astudillo OG, Cabrera M, and Abril MC. Prevalence of intestinal parasites and the absence of soil-transmitted helminths in Anatuya, Santiago del Estero, Argentina. Parasit.Vectors. 2018; 11(1):638-
- Phuphisut O, Yoonuan T, Sanguankiat S, Chaisiri K, Maipanich W, Pubampen S, Komalamisra C, and Adisakwattana P. Triplex polymerase chain reaction assay for detection of major soil-transmitted helminths, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus*, in fecal samples. Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health. 2014; 45(2):267-275.
- Pilotte N, Papaiakevou M, Grant JR, Bierwert LA, Llewellyn S, McCarthy JS, and Williams SA. Improved PCR-Based Detection of Soil Transmitted Helminth Infections Using a Next-

- Generation Sequencing Approach to Assay Design. PLoS.Negl.Trop.Dis. 2016; 10(3):e0004578-
- Pinlaor S, Mootsikapun P, Pinlaor P, Pipitgool V, and Tuangnadee R. Detection of opportunistic and non-opportunistic intestinal parasites and liver flukes in HIV-positive and HIV-negative subjects. Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health. 2005; 36(4):841-845.
- Pipikova J, Papajova I, Soltys J, and Schusterova I. Occurrence of the most common helminth infections among children in the Eastern Slovak Republic. Public Health. 2017; 150(71-76).
- Platts-Mills JA, Gratz J, Mduma E, Svensen E, Amour C, Liu J, Maro A, Saidi Q, Swai N, Kumburu H, McCormick BJ, Kibiki G, and Houpt ER. Association between stool enteropathogen quantity and disease in Tanzanian children using TaqMan array cards: a nested case-control study. Am.J.Trop.Med.Hyg. 2014; 90(1):133-138.
- Pocaterra LA, Ferrara G, Penaranda R, Rojas E, Perez-Chacon G, Hernan A, Certad G, Goldstein C, and Nunez L. Improved Detection of *Strongyloides stercoralis* in Modified Agar Plate Cultures. Am.J.Trop.Med.Hyg. 2017; 96(4):863-865.
- Prieto-Perez L, Perez-Tanoira R, Cabello-Ubeda A, Petkova-Saiz E, and Gorgolas-Hernandez-Mora M. [Geohelminths]. Enferm.Infecc.Microbiol.Clin. 2016; 34(6):384-389.
- Prociv P and Luke R. Observations on strongyloidiasis in Queensland aboriginal communities. Med.J.Aust. 1993; 158(3):160-163.
- Prociv P and Luke RA. The changing epidemiology of human hookworm infection in Australia. Med.J.Aust. 1995; 162(3):150-154.
- Puerta-Alcalde P, Gomez-Junyent J, Requena-Mendez A, Pinazo MJ, Alvarez-Martinez MJ, Rodriguez N, Gascon J, and Munoz J. High prevalence of *S. Stercoralis* infection among patients with Chagas disease: A retrospective case-control study. PLoS.Negl.Trop.Dis. 2018; 12(1):e0006199-
- Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, and Brooker SJ. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. Parasit.Vectors. 2014; 7(37-
- Puthiyakunnon S, Boddu S, Li Y, Zhou X, Wang C, Li J, and Chen X. Strongyloidiasis--an insight into its global prevalence and management. PLoS.Negl.Trop.Dis. 2014; 8(8):e3018-
- Ramanathan R, Burbelo PD, Groot S, Iadarola MJ, Neva FA, and Nutman TB. A luciferase immunoprecipitation systems assay enhances the sensitivity and specificity of diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. J.Infect.Dis. 2008; 198(3):444-451.
- Ramirez-Olivencia G, Espinosa MA, Martin AB, Nunez NI, de Las Parras ER, Nunez ML, and Puente SP. Imported strongyloidiasis in Spain. Int.J.Infect.Dis. 2014; 18(32-37).
- Rashwan N, Diawara A, Scott ME, and Prichard RK. Isothermal diagnostic assays for the detection of soil-transmitted helminths based on the SmartAmp2 method. Parasit.Vectors. 2017; 10(1):496-

- Ravi V, Ramachandran S, Thompson RW, Andersen JF, and Neva FA. Characterization of a recombinant immunodiagnostic antigen (NIE) from *Strongyloides stercoralis* L3-stage larvae. *Mol.Biochem.Parasitol.* 2002; 125(1-2):73-81.
- RCE (2019): (http://extranjeros.mitramiss.gob.es/es/estadisticas/operaciones/con-certificado/201906/Residentes_Principales_Resultados_30062019.pdf).
- Repetto SA, Ruybal P, Solana ME, Lopez C, Berini CA, Alba Soto CD, and Cappa SM. Comparison between PCR and larvae visualization methods for diagnosis of *Strongyloides stercoralis* out of endemic area: A proposed algorithm. *Acta Trop.* 2016; 157(169-177).
- Requena-Mendez A, Chiodini P, Bisoffi Z, Buonfrate D, Gotuzzo E, and Munoz J. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2013; 7(1):e2002-
- Robledo-Villegas M. and Posada Arango A. Datos biográficos y comentarios a su obra científica. *An.Acad.Med.Medellin.* 1995; 8(79-85).
- Roca C, Balanzo X, Sauca G, Fernandez-Roure JL, Boixeda R, and Ballester M. [Imported hookworm infection in African immigrants in Spain: study of 285 patients]. *Med.Clin.(Barc.).* 2003; 121(4):139-141.
- Rodrigues RM, de Oliveira MC, Sopenete MC, Silva DA, Campos DM, Taketomi EA, and Costa-Cruz JM. IgG1, IgG4, and IgE antibody responses in human strongyloidiasis by ELISA using *Strongyloides ratti* saline extract as heterologous antigen. *Parasitol.Res.* 2007; 101(5):1209-1214.
- Ruano AL, Lopez-Aban J, Gajate C, Mollinedo F, De Melo AL, and Muro A. Apoptotic mechanisms are involved in the death of *Strongyloides venezuelensis* after triggering of nitric oxide. *Parasite Immunol.* 2012; 34(12):570-580.
- Ruantip S, Eamudomkarn C, Techasen A, Wangboon C, Sithithaworn J, Bethony JM, Itoh M, and Sithithaworn P. Accuracy of Urine and Serum Assays for the Diagnosis of Strongyloidiasis by Three Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Protocols. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2019; 100(1):127-129.
- Saboya MI, Catala L, Nicholls RS, and Ault SK. Update on the mapping of prevalence and intensity of infection for soil-transmitted helminth infections in Latin America and the Caribbean: a call for action. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2013; 7(9):e2419-
- Sakti H, Nokes C, Hertanto WS, Hendratno S, Hall A, Bundy DA, and Satoto. Evidence for an association between hookworm infection and cognitive function in Indonesian school children. *Trop.Med.Int.Health.* 1999; 4(5):322-334.
- Sahimin N, Lim YAL, Douadi B, Mohd Khalid MKN, Wilson JJ, Behnke JM, and Mohd Zain SN. Hookworm infections among migrant workers in Malaysia: Molecular identification of *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*. *Acta Trop.* 2017; 173(109-115).
- Salas-Coronas J, Cabezas-Fernandez MT, Lozano-Serrano AB, Soriano-Perez MJ, Vazquez-Villegas J, and Cuenca-Gomez JA. Newly Arrived African Migrants to Spain: Epidemiology and Burden of Disease. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2018; 98(1):319-325.

- Salvador F, Molina I, Sulleiro E, Burgos J, Curran A, Van den Eynde E, Villar del SS, Navarro J, Crespo M, Ocana I, Ribera E, Falco V, and Pahissa A. Tropical diseases screening in immigrant patients with human immunodeficiency virus infection in Spain. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2013; 88(6):1196-1202.
- Salvador F, Sulleiro E, Sanchez-Montalva A, Saugar JM, Rodriguez E, Pahissa A, and Molina I. Usefulness of *Strongyloides stercoralis* serology in the management of patients with eosinophilia. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2014; 90(5):830-834.
- Salvador F, Sulleiro E, Piron M, Sanchez-Montalva A, Sauleda S, and Molina I. Seroprevalence of *Strongyloides stercoralis* infection among HTLV-I infected blood donors in Barcelona, Spain: A cross-sectional study. *Acta Trop.* 2017; 176(412-414).
- Salvador F, Trevino B, Chamorro-Tojeiro S, Sanchez-Montalva A, Herrero-Martinez JM, Rodriguez-Guardado A, Serre-Delcor N, Torrus D, Goikoetxea J, Zubero Z, Velasco M, Sulleiro E, Molina I, Lopez-Velez R, and Perez-Molina JA. Imported strongyloidiasis: Data from 1245 cases registered in the +REDIVI Spanish Collaborative Network (2009-2017). *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2019; 13(5):e0007399-
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).
- Samuel F, Demsew A, Alem Y, and Hailesilassie Y. Soil transmitted Helminthiasis and associated risk factors among elementary school children in ambo town, western Ethiopia. *BMC.Public Health.* 2017; 17(1):791-
- Sanchez PR, Guzman AP, Guillen SM, Adell RI, Estruch AM, Gonzalo IN, and Olmos CR. Endemic strongyloidiasis on the Spanish Mediterranean coast. *QJM.* 2001; 94(7):357-363.
- Sanprasert V, Kerdkaew R, Srirungruang S, Charuchaibovorn S, Phadungsaksawasdi K, and Nuchprayoon S. Development of Conventional Multiplex PCR: A Rapid Technique for Simultaneous Detection of Soil-Transmitted Helminths. *Pathogens.* 2019; 8(3):
- Satoh M, Toma H, Sato Y, Kikuchi M, Takara M, Shiroma Y, Kiyuna S, and Hirayama K. Production of a high level of specific IgG4 antibody associated with resistance to albendazole treatment in HLA-DRB1*0901-positive patients with strongyloidiasis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 1999; 61(4):668-671.
- Saugar JM, Merino FJ, Martin-Rabadan P, Fernandez-Soto P, Ortega S, Garate T, and Rodriguez E. Application of real-time PCR for the detection of *Strongyloides* spp. in clinical samples in a reference center in Spain. *Acta Trop.* 2015; 142(20-25).
- Sayasone S, Vonghajack Y, Vanmany M, Rasphone O, Tesana S, Utzinger J, Akkhavong K, and Odermatt P. Diversity of human intestinal helminthiasis in Lao PDR. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 2009; 103(3):247-254.
- Schaffel R, Nucci M, Carvalho E, Braga M, Almeida L, Portugal R, and Pulcheri W. The value of an immunoenzymatic test (enzyme-linked immunosorbent assay) for the diagnosis of strongyloidiasis in patients immunosuppressed by hematologic malignancies. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2001; 65(4):346-350.

- Schar F, Giardina F, Khieu V, Muth S, Vounatsou P, Marti H, and Odermatt P. Occurrence of and risk factors for *Strongyloides stercoralis* infection in South-East Asia. *Acta Trop.* 2016; 159(227-238).
- Schar F, Trostorf U, Giardina F, Khieu V, Muth S, Marti H, Vounatsou P, and Odermatt P. *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2013; 7(7):e2288-
- Schneider MC, Aguilera XP, Barbosa da Silva JJ, Ault SK, Najera P, Martinez J, Requejo R, Nicholls RS, Yadon Z, Silva JC, Leanes LF, and Periago MR. Elimination of neglected diseases in latin america and the Caribbean: a mapping of selected diseases. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2011; 5(2):e964-
- Schneider R, Obwaller A, and Auer H. Immunoblot for the detection of *Ascaris suum*-specific antibodies in patients with visceral larva migrans (VLM) syndrome. *Parasitol.Res.* 2015; 114(1):305-310.
- Segui R, Munoz-Antoli C, Klisiowicz DR, Oishi CY, Koster PC, de LA, Hernandez-de-Mingo M, Puente P, Toledo R, Esteban JG, and Carmena D. Prevalence of intestinal parasites, with emphasis on the molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* and *Blastocystis* sp., in the Paranagua Bay, Brazil: a community survey. *Parasit.Vectors.* 2018; 11(1):490-
- Sejdini A, Mahmud R, Lim YA, Mahdy M, Sejdini F, Gjoni V, Xhaferaj K, and Kasmi G. Intestinal parasitic infections among children in central Albania. *Ann.Trop.Med.Parasitol.* 2011; 105(3):241-250.
- Serrano-Moliner M, Morales-Suarez-Varela M, and Valero MA. Epidemiology and management of foodborne nematodiasis in the European Union, systematic review 2000-2016. *Pathog.Glob.Health.* 2018; 112(5):249-258.
- Sharifdini M, Ghanbarzadeh L, Kouhestani-Maklavani N, Mirjalali H, and Saraei M. Prevalence and Molecular Aspects of Human Hookworms in Guilan Province, Northern Iran. *Iran J.Parasitol.* 2017; 12(3):374-381.
- Shiraho EA, Eric AL, Mwangi IN, Maina GM, Kinuthia JM, Mutuku MW, Mugambi RM, Mwandji JM, and Mkoji GM. Development of a Loop Mediated Isothermal Amplification for Diagnosis of *Ascaris lumbricoides* in Fecal Samples. *J.Parasitol.Res.* 2016; 2016(7376207-
- Shore Garcia L. *Diagnostic Medical Parasitology*. 5th ed. ASM Press. 2007.
- Siddiqui AA and Berk SL. Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Clin.Infect.Dis.* 2001; 33(7):1040-1047.
- Siddiqui AA, Koenig NM, Sinensky M, and Berk SL. *Strongyloides stercoralis*: identification of antigens in natural human infections from endemic areas of the United States. *Parasitol.Res.* 1997; 83(7):655-658.
- Silva LP, Barcelos IS, Passos-Lima AB, Espindola FS, Campos DM, and Costa-Cruz JM. Western blotting using *Strongyloides ratti* antigen for the detection of IgG antibodies as confirmatory test in human strongyloidiasis. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz.* 2003; 98(5):687-691.

- Silver ZA, Kaliappan SP, Samuel P, Venugopal S, Kang G, Sarkar R, and Ajjampur SSR. Geographical distribution of soil transmitted helminths and the effects of community type in South Asia and South East Asia - A systematic review. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2018; 12(1):e0006153-
- Simeon D, Callender J, Wong M, Grantham-McGregor S, and Ramdath DD. School performance, nutritional status and trichuriasis in Jamaican schoolchildren. *Acta Paediatr.* 1994; 83(11):1188-1193.
- Sinniah B. Daily egg production of *Ascaris lumbricoides*: the distribution of eggs in the faeces and the variability of egg counts. *Parasitology.* 1982; 84(1):167-175.
- Sithithaworn J, Sithithaworn P, Janrungsopa T, Suvatanadecha K, Ando K, and Haswell-Elkins MR. Comparative assessment of the gelatin particle agglutination test and an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of strongyloidiasis. *J.Clin.Microbiol.* 2005; 43(7):3278-3282.
- Sithithaworn P, Srisawangwong T, Tesana S, Daenseekaew W, Sithithaworn J, Fujimaki Y, and Ando K. Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* in north-east Thailand: application of the agar plate culture technique compared with the enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 2003; 97(4):398-402.
- Sithithaworn P, Sukavat K, Vannachone B, Sophonphong K, Ben-Embarek P, Petney T, and Andrews R. Epidemiology of food-borne trematodes and other parasite infections in a fishing community on the Nam Ngum reservoir, Lao PDR. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health.* 2006; 37(6):1083-1090.
- Siwila J, Phiri IG, Enemark HL, Nchito M, and Olsen A. Intestinal helminths and protozoa in children in pre-schools in Kafue district, Zambia. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.* 2010; 104(2):122-128.
- Soriano-Arandes A, Sulleiro E, Zarzuela F, Ruiz E, Claveria I, and Espasa M. Discordances Between Serology and Culture for *Strongyloides* in an Ethiopian Adopted Child With Multiple Parasitic Infections: A Case Report. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(10):e3040-
- Soukhathammavong PA, Sayasone S, Phongluxa K, Xayaseng V, Utzinger J, Vounatsou P, Hatz C, Akkhavong K, Keiser J, and Odermatt P. Low efficacy of single-dose albendazole and mebendazole against hookworm and effect on concomitant helminth infection in Lao PDR. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2012; 6(1):e1417-
- Sousa-Figueiredo JC, Stanton MC, Katokele S, Arinaitwe M, Adriko M, Balfour L, Reiff M, Lancaster W, Noden BH, Bock R, and Stothard JR. Mapping of Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminths in Namibia: The First Large-Scale Protocol to Formally Include Rapid Diagnostic Tests. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2015; 9(7):e0003831-
- Speare R, Miller A, and Page WA. Strongyloidiasis: a case for notification in Australia? *Med.J.Aust.* 2015; 202(10):523-524.
- Speich B, Moser W, Ali SM, Ame SM, Albonico M, Hattendorf J, and Keiser J. Efficacy and reinfection with soil-transmitted helminths 18-weeks post-treatment with albendazole-ivermectin, albendazole-mebendazole, albendazole-oxantel pamoate and mebendazole. *Parasit.Vectors.* 2016; 9(123-

- Starr MC and Montgomery SP. Soil-transmitted Helminthiasis in the United States: a systematic review--1940-2010. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2011; 85(4):680-684.
- Stewart FH. ON THE LIFE-HISTORY OF *ASCARIS LUMBRICOIDES*. *Br.Med.J.* 1916; 2(2918):753-754.
- Strkolcova G, Goldova M, Bockova E, and Mojzisova J. The roundworm *Strongyloides stercoralis* in children, dogs, and soil inside and outside a segregated settlement in Eastern Slovakia: frequent but hardly detectable parasite. *Parasitol.Res.* 2017; 116(3):891-900.
- Sturrock HJ, Picon D, Sabasio A, Oguttu D, Robinson E, Lado M, Rumunu J, Brooker S, and Kolaczinski JH. Integrated mapping of neglected tropical diseases: epidemiological findings and control implications for northern Bahr-el-Ghazal State, Southern Sudan. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2009; 3(10):e537-
- Sudre AP, Siqueira RC, Barreto MG, Peralta RH, Macedo HW, and Peralta JM. Identification of a 26-kDa protein fraction as an important antigen for application in the immunodiagnosis of strongyloidiasis. *Parasitol.Res.* 2007; 101(4):1117-1123.
- Sultana Y, Gilbert GL, Ahmed BN, and Lee R. Seroepidemiology of *Strongyloides stercoralis* in Dhaka, Bangladesh. *Parasitology.* 2012; 139(11):1513-1520.
- Sultana Y, Jeffreys N, Watts MR, Gilbert GL, and Lee R. Real-time polymerase chain reaction for detection of *Strongyloides stercoralis* in stool. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2013; 88(6):1048-1051.
- Supali T, Verweij JJ, Wiria AE, Djuardi Y, Hamid F, Kaisar MM, Wammes LJ, van LL, Luty AJ, Sartono E, and Yazdanbakhsh M. Polyparasitism and its impact on the immune system. *Int.J.Parasitol.* 2010; 40(10):1171-1176.
- Sykes AM and McCarthy JS. A coproantigen diagnostic test for *Strongyloides* infection. *PLoS.Negl.Trop.Dis.* 2011; 5(2):e955-
- Tadege B and Shimelis T. Infections with *Schistosoma mansoni* and geohelminths among school children dwelling along the shore of the Lake Hawassa, southern Ethiopia. *PLoS.One.* 2017; 12(7):e0181547-
- Tamarozzi F, Martello E, Giorli G, Fittipaldo A, Staffolani S, Montresor A, Bisoffi Z, and Buonfrate D. Morbidity Associated with Chronic *Strongyloides stercoralis* Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2019; 100(6):1305-1311.
- Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, Sobuz SU, Lieshout L, Petri WA, Jr., Haque R, and Houpt ER. High throughput multiplex PCR and probe-based detection with Luminex beads for seven intestinal parasites. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 2011; 84(2):332-337.
- Tay J, De Haro I, Romero R, Alonso T, Cisneros M, Ruiz A, Sánchez JT. Parasitosis intestinal en comunidades condiferente disponibilidad de servicios de drenaje. *Revista de Enfermedades Infecciosas de Pediatría.* 1993;6: 55-58.
- Truant AL, Elliott SH, Kelly MT, and Smith JH. Comparison of formalin-ethyl ether sedimentation, formalin-ethyl acetate sedimentation, and zinc sulfate flotation techniques for detection of intestinal parasites. *J.Clin.Microbiol.* 1981; 13(5):882-884.

- Truscott JE, Turner HC, and Anderson RM. What impact will the achievement of the current World Health Organisation targets for anthelmintic treatment coverage in children have on the intensity of soil transmitted helminth infections? *Parasit.Vectors*. 2015; 8(551-
- Udonsi JK and Atata G. *Necator americanus*: temperature, pH, light, and larval development, longevity, and desiccation tolerance. *Exp.Parasitol*. 1987; 63(2):136-142.
- Uparanukraw P, Phongsri S, and Morakote N. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. *Am.J.Trop.Med.Hyg*. 1999; 60(6):967-973.
- VAN Doorn HR, Koelewijn R, Hofwegen H, Gilis H, Wetsteyn JC, Wismans PJ, Sarfati C, Vervoort T, and van GT. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. *J.Clin.Microbiol*. 2007; 45(2):438-442.
- Varkey P, Jerath AU, Bagniewski S, and Lesnick T. Intestinal parasitic infection among new refugees to Minnesota, 1996-2001. *Travel.Med.Infect.Dis*. 2007; 5(4):223-229.
- Vercruysse J, Behnke JM, Albonico M, Ame SM, Angebault C, Bethony JM, Engels D, Guillard B, Nguyen TV, Kang G, Kattula D, Kotze AC, McCarthy JS, Mekonnen Z, Montresor A, Periago MV, Sumo L, Tchuente LA, Dang TC, Zeynudin A, and Levecke B. Assessment of the anthelmintic efficacy of albendazole in school children in seven countries where soil-transmitted helminths are endemic. *PLoS.Negl.Trop.Dis*. 2011; 5(3):e948-
- Verweij JJ, Brienens EA, Ziem J, Yelifari L, Polderman AM, and van LL. Simultaneous detection and quantification of *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, and *Oesophagostomum bifurcum* in fecal samples using multiplex real-time PCR. *Am.J.Trop.Med.Hyg*. 2007; 77(4):685-690.
- Verweij JJ, Canales M, Polman K, Ziem J, Brienens EA, Polderman AM, and van LL. Molecular diagnosis of *Strongyloides stercoralis* in faecal samples using real-time PCR. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg*. 2009; 103(4):342-346.
- Verweij JJ. Application of PCR-based methods for diagnosis of intestinal parasitic infections in the clinical laboratory. *Parasitology*. 2014; 141(14):1863-1872.
- Watts MR, James G, Sultana Y, Ginn AN, Outhred AC, Kong F, Verweij JJ, Iredell JR, Chen SC, and Lee R. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Strongyloides stercoralis* in stool that uses a visual detection method with SYTO-82 fluorescent dye. *Am.J.Trop.Med.Hyg*. 2014; 90(2):306-311.
- Weatherhead JE, Hotez PJ, and Mejia R. The Global State of Helminth Control and Elimination in Children. *Pediatr.Clin.North Am*. 2017; 64(4):867-877.
- Weaver HJ, Hawdon JM, and Hoberg EP. Soil-transmitted helminthiasis: implications of climate change and human behavior. *Trends Parasitol*. 2010; 26(12):574-581.
- WHO, 2002. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee. Geneva: World Health Organization; 2002. Available_from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42588>

- WHO, 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical Diseases. First WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2010.
Available_from:https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44440/9789241564090_eng.pdf;jsessionid=B7D33F949072BED468B7F0FCFE8A80DF?sequence=1
- WHO, 2018. Helminth control in school-age children: a guide for managers of control programmes 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2011. Available_from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548267_eng.pdf. Accessed Feb 2018.
- Widjana DP and Sutisna P. Prevalence of soil-transmitted helminth infections in the rural population of Bali, Indonesia. Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health. 2000; 31(3):454-459.
- Yap P, Du ZW, Wu FW, Jiang JY, Chen R, Zhou XN, Hattendorf J, Utzinger J, and Steinmann P. Rapid re-infection with soil-transmitted helminths after triple-dose albendazole treatment of school-aged children in Yunnan, People's Republic of China. Am.J.Trop.Med.Hyg. 2013; 89(1):23-31.
- Yetim I, Ozkan OV, Semerci E, Abanoz R. Rare cause of intestinal obstruction, *Ascaris lumbricoides* infestation: two case reports. 2009. Cases J 2:7970.
- Yori PP, Kosek M, Gilman RH, Cordova J, Bern C, Chavez CB, Olortegui MP, Montalvan C, Sanchez GM, Worthen B, Worthen J, Leung F, and Ore CV. Seroepidemiology of strongyloidiasis in the Peruvian Amazon. Am.J.Trop.Med.Hyg. 2006; 74(1):97-102.
- Yoshida A, Kikuchi T, Nakagaki S, and Maruyama H. Optimal ELISA antigen for the diagnosis of *Ascaris suum* infection in humans. Parasitol.Res. 2016; 115(12):4701-4705.
- Zubrinich CM, Puy RM, O'Hehir RE, and Hew M. *Strongyloides* infection as a reversible cause of chronic urticaria. J.Asthma Allergy. 2019; 12(67-69).
- Zukiewicz M, Kaczmarek M, Topczewska M, Sidor K, and Tomaszewska BM. Epidemiological and clinical picture of parasitic infections in the group of children and adolescents from north-east region of Poland. Wiad.Parazytol. 2011; 57(3):179-187.

A decorative graphic on the left side of the page. It features a large, light yellow diamond shape. Inside this diamond, there is a smaller, darker yellow diamond. The background of the entire page is a light yellow color. The word "Anexos" is written in a bold, dark brown font on the right side of the page.

Anexos

CUESTIONARIO PREVALENCIA ESTRONGILOIDIASIS PRIMERA VISITA			
Inclusión del paciente (1=Localizado y consentimiento firmado; 2=Localizado y consentimiento NO firmado; 3=No localizado)			
SI INCLUSIÓN DEL PACIENTE=2 o 3, NO RELLENAR EL CUESTIONARIO			
Datos demográficos			
1	Código participante	STR	_ - _ _ _ _
2	Fecha de la visita (dd/mm/yy)		_ _ _ / _ _ _ / _ _
3	Número Historia Clínica		_ _ _ _ _ _ _ _ _
4	Fecha de nacimiento (dd/mm/yy)		_ _ _ / _ _ _ / _ _
5	Sexo (1=Hombre, 2=Mujer)		_
6	Tipo paciente (1= Expatriado (>1 año), 2=Inmigrante, 3= Autóctono, 4=Desconocido)		_
7	País de origen		_ _ _ _ _ _ _ _ _
8	Si extranjero, año de llegada a España (Marcar 9999 si no extranjero)		_ _ _ _
9	País de adquisición <i>Strongyloides</i> (1=Desconocido (varias posibilidades), 2=Conocido)		_
10	Embarazo (1=Primer trimestre, 2=Segundo trimestre, 3=Tercer trimestre, 4=No, 5=No aplicable)		_
Antecedentes Patológicos			
11	Paciente inmunosuprimido (1= Si, 2=No, 3=Desconocido)		_
12	Motivo de inmunosupresión 1 (1= Ninguno, 2=Trasplante, 3= Neoplasia, 4=Enfermedad autoinmune, 5=VIH, 6=Tratamiento crónico con corticoides por otra causa 7=Otros)		_
13	Motivo de inmunosupresión 2 (1= Ninguno, 2=Trasplante, 3= Neoplasia, 4=Enfermedad autoinmune, 5=VIH, 6=Tratamiento crónico con corticoides por otra causa 7=Otros)		_
14	Motivo de inmunosupresión 3 (1= Ninguno, 2=Trasplante, 3= Neoplasia, 4=Enfermedad autoinmune, 5=VIH, 6=Tratamiento crónico con corticoides por otra causa 7=Otros)		_
15	Antecedente de tratamiento con corticoides (1=Nunca ha tomado, 2=en los últimos 3 meses, 3=entre 3-6 meses, 4= entre 6-12 meses, 5=hace más de un año)		_
16	Trasplante (1= No trasplante, 2= Renal, 3=Hígado, 4=Corazón, 5=Pulmón, 6= Páncreas 7= Hematológico, 8=Otros)		_
17	Neoplasia (1= No Neoplasia, 2=Mama, 3= Próstata, 4= Colorectal, 5= Pulmón, 6=Ginecológico, 7=Hematológico, 8=Otros)		_
18	Enfermedad autoinmune (1=No enf. autoinmune, 2=Órgano-específica, 3=Sistémica)		_
19	Tratamiento quimioterapia: 0= Nunca ha recibido, 1=Recibido en los últimos 3 meses, 2=Entre 3-6 meses, 3= entre 6-12 meses, 4= hace más de 1 año.		_
20	Infección por VIH (1=No VIH, 2=>500 CD4, 3= 200-500 CD4, 4=<200 CD4)		_
21	Última carga viral VIH _____ (Marcar 9 si VIH negativo)		
22	Toma antiretrovirales (1=No, 2=Si)		_
23	Otra causa de inmunosupresión (1=No, 2= Si)		_
24	Fármacos inmunosupresores que toma actualmente o en los últimos 3 meses (1=No toma, 2=Si toma)		_

Anexo 2. Cuestionario de estudio de geohelminths y *Strongyloides stercoralis*Cuestionario de estudio de geohelminths y *Strongyloides stercoralis*

CUESTIONARIO DE ESTUDIO DE GEOHELMINTOS Y <i>STRONGYLOIDES STERCORALIS</i>	
Datos demográficos	
1	Código participante <input type="text"/>
2	Fecha de la visita (dd/mm/yy) <input type="text"/>
3	Número Historia Clínica <input type="text"/>
4	Fecha de nacimiento (dd/mm/yy) <input type="text"/>
5	Sexo (1=Hombre, 2=Mujer) <input type="text"/>
6	Tipo paciente (1= Viajero, 2=Inmigrante,3= Desconocido) <input type="text"/>
7	País de origen <input type="text"/>
8	Año de llegada a España <input type="text"/>
9	Inmigrante: Tiempo transcurrido de la última visita a país de origen (1=Desconocido (varias posibilidades), 2=Conocido) <input type="text"/>
10	Viajero: Tiempo transcurrido de la última visita a región tropical (1=Desconocido (varias posibilidades), 2=Conocido) <input type="text"/>
Antecedentes Patológicos	
11	Manifestaciones alérgicas (1=Leve, 2=Moderada, 3=Grave, 4=No alergias, 5=Desconocido) <input type="text"/>
12	Paciente inmunosuprimido (1= Si, 2=No, 3=Desconocido) <input type="text"/>
13	Motivo de inmunosupresión (1= No inmunodeprimido, 2=Trasplante, 3= Neoplasia, 4=Enfermedad autoinmune, 5=VIH, 6= Otros) <input type="text"/>
14	Trasplante (1= No trasplante, 2= Renal, 3=Hígado, 4=Corazón, 5=Pulmón, 6= Páncreas 7= Hematológico, 8=Otros) <input type="text"/>
15	Neoplasia (1= No Neoplasia, 2=Mama, 3= Próstata, 4= Colorectal, 5= Pulmón, 6=Ginecológico, 7=Hematológico, 8=Otros) <input type="text"/>
16	Enfermedad autoinmune (1=No enf. autoinmune, 2=Órgano-específica, 3=Sistémica) <input type="text"/>
17	Infección por VIH (1=No VIH, 2=>500 CD4, 3= 200-500 CD4, 4=<200 CD4) <input type="text"/>
18	Toma antiretrovirales (1=No, 2=Si) <input type="text"/>
19	Otra causa de inmunosupresión (1=No, 2= Si) <input type="text"/>
20	Fármacos inmunosupresores (1=No toma, 2=Si toma) <input type="text"/>
21	Inmunosupresor 1 <input type="text"/> Dosis y fecha de inicio <input type="text"/>
22	Inmunosupresor 2 <input type="text"/> Dosis y fecha de inicio <input type="text"/>
23	Inmunosupresor 3 <input type="text"/> Dosis y fecha de inicio <input type="text"/>
24	Inmunosupresor 4 <input type="text"/> Dosis y fecha de inicio <input type="text"/>
25	Tratamiento antihelmíntico previo (1=No, 2=Si) <input type="text"/>
26	Anti helmíntico <input type="text"/> Dosis y fecha de inicio <input type="text"/>